

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO DE LOS SANTOS**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN  
MANEJO DE SUELOS Y AGUA**

**PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS  
RIZOSFÉRICOS CONTRA PATÓGENOS DE CULTIVARES DE ARROZ EN LA  
REPÚBLICA DE PANAMÁ.**

**JHOEL ANTONIO TUÑÓN RÍOS**

**CIP: 9-733-291**

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN  
MANEJO DE SUELOS Y AGUA**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2018**

**PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS  
RIZOSFÉRICOS CONTRA PATÓGENOS DE CULTIVARES DE ARROZ EN LA  
REPÚBLICA DE PANAMÁ.**

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN  
MANEJO DE SUELOS Y AGUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**APROBADO**

\_\_\_\_\_ Asesor

Rito Herrera Vega Ph.D.

\_\_\_\_\_ Co-Asesor

Martha Chaves de Von Chong M.Sc.

2018

## **DEDICATORIA**

A mis padres Eduvigis Ríos y Pablo Trujillo por ser los pilares más importante en mi vida, demostrándome siempre su cariño y apoyo incondicional. A mis abuelos Elidia Valdés y Basilio Guevara por ser un ejemplo de humildad y amor. A Lexandra Isabel Vega y a mi familia por ser el motivo de inspiración al demostrarme que no hay obstáculos insuperables ni un límite cuando la unión y el amor se convierten en el núcleo que dirige nuestras vidas.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente a Dios por darme vida y fortaleza para alcanzar esta meta en mi vida profesional. A mis asesores de tesis, Martha Von Chong y Rito Herrera por su asesoría, por su paciencia, apoyo y confianza y por su capacidad para orientar mis ideas a fin de llevar a buen término este trabajo de investigación. A mis compañeros y amigos de trabajo, Leonel Rivera, Miguel Ríos, Ervin Romero, Vielka Batista, Rita Cruz, Nohelia Medina, por sus buenas vibras y apoyo, enseñándome a valorar cada día más la importancia que tiene la camaradería cuando se busca un fin. A mis amigos Luis Alberto Barahona por su apoyo técnico, Alex Cruz, Lucas Guerra, Rolando Corella por sus buenos consejos y por brindar esa palabra de aliento en los momentos indicados.

## INDICE GENERAL

### Contenido

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
INDICE GENERAL .....	iii
INDICE DE TABLAS .....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS .....	5
Objetivo General .....	5
Objetivos Específicos.....	5
I. MARCO TEÓRICO .....	6
1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE ARROZ ( <i>Oryza sativa</i> ).....	6
1.1. Fenología del arroz .....	7
1.2. Patógenos de importancia en cultivo de arroz .....	8
1.3. <i>Burkholderia glumae</i> patógeno del cultivo de arroz.....	9
1.3.1. El añublo bacterial de la panícula de arroz.....	11
1.3.2. Síntomas del añublo bacterial de la panícula del arroz.....	11
1.4. <i>Magnaporthe oryzae</i> (Anamorfo <i>Pyricularia oryzae</i> ) patógeno del cultivo de arroz .....	13
1.4.1. Piriculariosis (tizón o quemazón) del arroz.....	15
2. EL SUELO Y LOS MICROORGANISMOS .....	17
2.1. Hongos de suelo.....	18
2.2. Bacterias de suelo .....	19
2.3. Importancia de los microorganismos del suelo .....	21
3. LA RIZÓSFERA.....	21
3.1 Interacción rizósfera –microorganismos .....	22

4. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PATÓGENOS.....	24
4.1 Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas.....	25
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
1. COLECTA DE CAMPO .....	26
2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	28
3. AISLAMIENTO, PRUEBAS DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS DEL CULTIVO DE ARROZ ( <i>Oryza sativa</i> ).....	31
3.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas. ....	31
3.2. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de las bacterias rizosféricas ante el fitopatógeno <i>Burkholderia glumae</i> .....	31
3.3. Identificación de bacterias con actividad antagónica .....	34
3.4. Cinética de crecimiento bacteriano.....	34
4. AISLAMIENTO, PRUEBAS DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS RIZOSFÉRICOS DEL CULTIVO DE ARROZ ( <i>Oryza sativa</i> ).....	35
4.1. Aislamiento de hongos rizosféricos.....	35
4.2. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de los hongos aislados de la rizósfera frente <i>Pyricularia oryzae</i> .....	37
4.3. Identificación de hongos con actividad antagónica .....	40
5. Variables evaluadas en la prospección de bacterias y hongos de la rizósfera del arroz. ....	40
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
1. BACTERIAS RIZOSFÉRICAS .....	41
1.1. Prospección de Bacterias Rizosféricas en el Cultivo de Arroz .....	41
1.2. Determinación de la Capacidad Antagónica en Bacterias .....	46
1.3. Cinética de Crecimiento Bacteriano .....	54
2. HONGOS RIZOSFERICOS .....	58
2.1. Prospección de Hongos Rizosféricos en el Cultivo de Arroz.....	58
2.2. Determinación de la Capacidad Antagónica en Hongos .....	61
IV. CONCLUSIONES.....	73
V. RECOMENDACIONES.....	74
VI. REFERENCIAS .....	75
VII. ANEXOS .....	79

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Burkholderia glumae</i> .....	10
<b>Tabla 2.</b> Taxonomía de <i>Pyricularia oryzae</i> .....	13
<b>Tabla 3.</b> Descripción de la variedad de arroz GAB 8 .....	27
<b>Tabla 4.</b> Descripción de los muestreos por fases fenológicas y ciclo del cultivo .....	28
<b>Tabla 5.</b> Esquema de las pruebas de antagonismo in vitro entre las bacterias aisladas y <i>B.glumae</i> .....	32
<b>Tabla 6.</b> Aislamientos de bacterias y hongos rizosféricos por fases fenológicas, durante dos ciclos del cultivo.....	36
<b>Tabla 7.</b> Esquema de las pruebas de antagonismo in vitro entre las cepas fúngicas aisladas y <i>P. oryzae</i> . .....	38
<b>Tabla 8.</b> Variables evaluadas en la prospección de hongos y bacterias de la rizósfera del arroz. ....	40
<b>Tabla 9.</b> Resumen de ajustes (Datos de las bacterias rizosféricas). ....	41
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para el total de bacterias aisladas de la rizósfera del arroz. ....	42
<b>Tabla 11.</b> Estimación de parámetros (ANOVA)-Bacterias de la rizósfera del arroz.....	43
<b>Tabla 12.</b> Cepas bacterianas con el mayor porcentaje de inhibición frente a <i>B.glumae</i> . 48	
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza para el halo de inhibición formado por las bacterias identificadas .....	50
<b>Tabla 14.</b> Cepas seleccionadas para la cinética de crecimiento bacteriano .....	55
<b>Tabla 15.</b> Datos de la absorbancia Cepa R6 vs <i>B.glumae</i> .....	55
<b>Tabla 16.</b> Datos de la absorbancia Cepa R14 vs <i>B.glumae</i> .....	56
<b>Tabla 17.</b> Resumen de Ajuste-Datos de la prospección de hongos rizosféricos.....	58
<b>Tabla 18.</b> Análisis de varianza para el total de hongos aislados de la rizósfera del arroz	59
<b>Tabla 19.</b> Estimación de parámetros-Prospección de hongos rizosféricos. ....	60
<b>Tabla 20.</b> ANOVA de 1 Factor .....	62
<b>Tabla 21.</b> ANOVA-Cepas fúngicas identificadas con capacidad antagónica.....	64
<b>Tabla 22.</b> Prueba de Tukey-Kramer para las cepas fúngicas identificadas.....	65

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de diferentes fases y etapas del crecimiento y desarrollo de la planta de arroz.....	7
<b>Figura 2.</b> Secciones de la rizósfera.. .....	22
<b>Figura 3.</b> Parcela experimental. ....	26
<b>Figura 4.</b> Secciones de la rizosférica del arroz . ....	29
<b>Figura 5.</b> Separando las secciones de la rizosfera de arroz.....	30
<b>Figura 6.</b> Proceso de homogenización de las secciones de la rizósfera .....	30
<b>Figura 7.</b> Diagrama de dilución seriada. ....	35
<b>Figura 8.</b> Histograma. Normalidad de los datos de enfrentamiento Bacterias rizosféricas vs <i>B. glumae</i> .....	46
<b>Figura 9.</b> Bacterias con capacidad antagonica .....	47
<b>Figura 10.</b> Tamaño de los halos de inhibición de las cepas identificadas (por réplica)....	49
<b>Figura 11.</b> Gráfico de Cajas. Diámetros del halo de inhibición de las cepas bacterianas identificadas. ....	51
<b>Figura 12.</b> Cinética de crecimiento <i>B.glumae</i> vs <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	56
<b>Figura 13.</b> Cinética de crecimiento <i>B. glumae</i> vs <i>Bacillus spp.</i> .....	57
<b>Figura 14.</b> Prospección de hongos aislados de la rizósfera del arroz. ....	61
<b>Figura 15.</b> Géneros fúngicos con capacidad antagonica.....	62
<b>Figura 16.</b> Gráfico caja barras de las cepas identificadas).....	63
<b>Figura 17.</b> Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> <i>Trichoderma spp</i> vs <i>P. oryzae</i> . ....	66
<b>Figura 18.</b> Microparasitismo de <i>Trichoderma spp</i> sobre <i>P. oryzae</i> .....	68
<b>Figura 19.</b> Cepa de <i>Penicillium spp.</i> (morfo tipo r1).. .....	69
<b>Figura 20.</b> Cepa de <i>Penicillium spp.</i> (morfo tipo r2).....	69
<b>Figura 21.</b> Cepa de <i>Aspergillus spp.</i> Cepa de <i>Aspergillus flavus</i> . Cepa de <i>Aspergillus niger</i> .....	70
<b>Figura 22.</b> Enfrentamiento dual de cepa <i>Aspergillus flavus</i> vs <i>P. oryzae</i> . Enfrentamiento dual de la cepa <i>Aspergillus spp.</i> vs <i>P. oryzae</i> .....	71



# PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS CONTRA PATÓGENOS DE CULTIVARES DE ARROZ EN LA REPÚBLICA DE PANAMÁ

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación consistió en prospectar y caracterizar microorganismos rizosféricos contra patógenos de cultivares de arroz en la República de Panamá. Para ello, se tomaron muestras de la rizósfera del arroz (*Oryza sativa*) de la variedad GAB 8, en una parcela bajo la modalidad de agricultura orgánica de subsistencia. Se aislaron hongos (agar PDA) y bacterias rizosféricas (agar TSA) determinando diferencias significativas en el total de aislamientos para las variables ciclos de cultivo (2016, 2017), secciones de la rizósfera (sección suelo, sección raíz, mezcla de suelo+raíz), fases fenológicas (vegetativa, floración, maduración) y diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). Se evaluó la capacidad antagónica de las bacterias rizosféricas ante la bacteria fitopatógena *Burkholderia glumae* y de los hongos rizosféricos frente *Pyricularia oryzae*. La mayor capacidad inhibitoria frente a *B. glumae* lo presentaron 6 cepas identificadas como *Bacillus spp*, 2 cepas identificadas como *Bacillus cereus*, 1 cepa identificada como *Bacillus subtilis* y 1 cepa identificada como *Lactobacillus plantarum*. De las 20 cepas fúngicas que mostraron actividad antagónica contra *P. oryzae*, 2 cepas corresponden a la especie *Aspergillus flavus*, 3 a *Aspergillus niger*, 2 a *Aspergillus spp*, 2 a *Penicillium spp* (morfo tipo r1), 5 a *Penicillium spp* (morfo tipo r2) y 6 a *Trichoderma spp*.

**PALABRAS CLAVES:** arroz, rizósfera, *B. glumae*, *P. oryzae*, bacterias antagonistas, hongos antagonistas.

# PROSPECTION AND CHARACTERIZATION OF RIZOSPHERIC MICROORGANISMS AGAINST PATHOGENS OF RICE CULTIVARS IN THE REPUBLIC OF PANAMA

## ABSTRACT

The present research work consisted in prospecting and characterizing rhizospheric microorganisms against pathogens of rice cultivars in the Republic of Panama. To do this, samples were taken from the rhizosphere of rice (*Oryza sativa*) of the GAB 8 variety, in a plot under the modality of organic subsistence agriculture. Fungi (PDA agar) and rhizospheric bacteria (TSA agar) were isolated, determining significant differences in the total isolates for the variable crop cycles (2016, 2017), sections of the rhizosphere (soil section, root section, soil + root mixture). ), phenological phases (vegetative, flowering, maturation) and dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ ). The antagonistic capacity of the rhizospheric bacteria was evaluated against the phytopathogenic bacterium *Burkholderia glumae* and the rhizospheric fungi against *Pyricularia oryzae*. The highest inhibitory capacity against *B. glumae* was presented by 6 strains identified as *Bacillus spp*, 2 strains identified as *Bacillus cereus*, 1 strain identified as *Bacillus subtilis* and 1 strain identified as *Lactobacillus plantarum*. Of the 20 fungal strains that showed antagonistic activity against *P. oryzae*, 2 strains correspond to the species *Aspergillus flavus*, 3 to *Aspergillus niger*, 2 to *Aspergillus spp*, 2 to *Penicillium spp* (morphotype r1), 5 to *Penicillium spp* (morphotype r2) and 6 to *Trichoderma spp*.

**KEYS WORDS:** rice, rhizosphere, *B. glumae*, *P. oryzae*, antagonist bacteria, antagonistic fungi.

## INTRODUCCIÓN

Panamá es el mayor consumidor de arroz en centroamérica (68 kg/persona) (FAO, 2013) siendo uno de los alimentos indispensables en la dieta del panameño. En consecuencia, su producción tiene una gran importancia a nivel social, político, económico y sobre todo, en lo relacionado con la seguridad alimentaria del país (IICA, 2009).

En el cultivo del arroz las enfermedades de origen microbiano constituyen uno de los factores que inciden en la obtención de bajos rendimientos y manchado de los granos. Estas enfermedades pueden ser provocadas por diversos microorganismos como hongos, bacterias y virus (Acebo *et al.* 2011). El Añublo bacteriano de la panícula del arroz, causado por *Burkholderia glumae* es una de ellas, adquiriendo gran relevancia en los últimos años. Otro patógeno de alta incidencia en los cultivares de arroz es el hongo *Pyricularia oryzae* que a pesar de contar en nuestro país con variedades tolerantes, se considera uno de los fitopatógenos de mayor importancia en el cultivo. Ambos fueron considerados en nuestra investigación, por el hecho de provocar disminución en la calidad del grano, por causar bajos rendimientos, por su agresividad y difícil manejo en campo, lo que se refleja en pérdidas económicas, perjudicando la producción de arroz, rubro básico para la población de nuestro país.

En las últimas décadas el control biológico de plagas y enfermedades en la agricultura ha adquirido gran importancia frente a los problemas fitosanitarios ocurridos por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos en la agricultura, lo cual ha traído como

consecuencia severos problemas de contaminación al medio ambiente y ha generado la resistencia de plagas y enfermedades, así como la presencia de nuevas especies de microorganismos fitopatógenos con un grado de afectación más virulento (Quesada y García, 2014).

La rizósfera, gracias a su ambiente rico en energía y nutrientes, alberga grandes poblaciones de la mayor parte de los grupos de microorganismos del suelo (Jaramillo, 2002). Estudios en microbiología y biocontrol demuestran que la flora microbiana encontrada en la rizósfera puede desempeñar una acción antagónica contra fitopatógenos; de allí nuestro interés en explorar la microbiota autóctona.

La tendencia cada vez más acentuada a disminuir los costos de producción y los niveles de residuos químicos en los productos agrícolas, el respeto por el medio ambiente y la falta de productos eficaces en muchos casos, sitúa al control biológico como una alternativa o al menos un complemento del control químico (Poveda y Cruz, 2010). Siendo Panamá un gran consumidor de arroz, es necesario que se le impriman mayor dinamismo y agresividad a la búsqueda de métodos alternativos de control de estas enfermedades.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Prospectar y caracterizar microorganismos rizosféricos contra patógenos de cultivos de arroz en la República de Panamá.

### Objetivos Específicos

- Aislar bacterias y hongos de la rizósfera del arroz en una localidad de la República de Panamá.
- Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de la microbiota aislada ante cepas de los fitopatógenos *Burkholderia glumae* y *Pyricularia oryzae*.
- Identificar hongos y bacterias que presentaron actividad antagónica frente a los fitopatógenos.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)

La planta de arroz (*Oryza sativa*) pertenece a la familia de las gramíneas, del orden Poales. Se caracteriza morfológicamente por poseer espigas con flores solitarias y no poseer glumas. Su tallo es erguido de entre 60-120 cm de longitud, sus hojas son largas y planas, las flores son de color verde las cuales forman una panoja grande, terminal y colgante después de la floración. Las raíces son delgadas y fibrosas, la inflorescencia constituye una panícula, siendo cada unidad de esta panícula una espiga, el grano o semilla es de color café o color rojo (Pedraza, 2012)

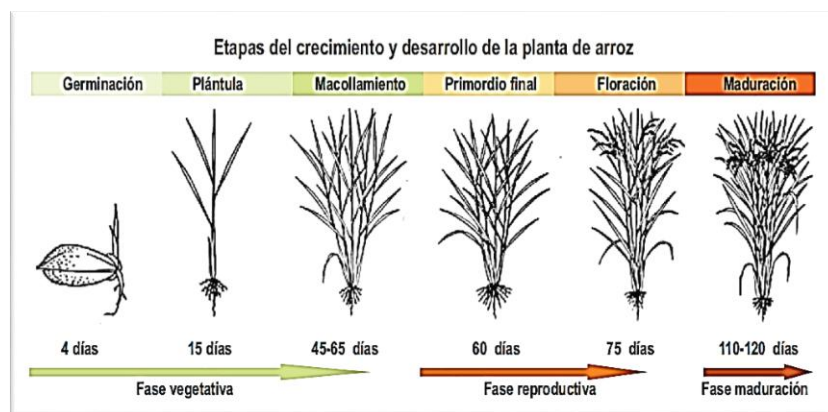
En los últimos años las preocupaciones ambientales y sanitarias alrededor del abuso de agroquímicos y la ineficiencia en técnicas de irrigación y aplicación de fertilizantes propias de grandes cultivos comerciales, han planteado serios cuestionamientos sobre la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas de producción agrícola moderna.

Panamá, es uno de los países centroamericanos con mayor consumo de arroz, donde el consumo anual per cápita es de aproximadamente 70 kilogramos (Barría, 2012). Siendo el arroz uno de los alimentos indispensables en la dieta del panameño, en consecuencia, su producción tiene una gran importancia a nivel social, político, económico y en especial en lo relacionado a la seguridad alimentaria del país (IICA-MIDA, 2008).

## 1.1. Fenología del arroz

La fenología agrícola se refiere a los fenómenos periódicos que presentan las plantas y su relación con las condiciones ambientales, tales como temperatura, luz, humedad, entre otras.

Una fase fenológica (Figura 1) se refiere a la aparición, transformación o desaparición rápida de los órganos vegetales; son fácilmente identificables, ya que marcan cambios fisiológicos y morfológicos. La historia de la vida de la planta de arroz presenta tres fases importantes, la *fase vegetativa* (período desde la germinación hasta el macollamiento), *fase reproductiva o floración* (desde la iniciación del primordio de la panícula hasta la floración), *fase de maduración* (a partir de la floración hasta la madurez) (Camargo *et al*, 2014).



**Figura 1.** Esquema de las diferentes fases y etapas del crecimiento y desarrollo de la planta de arroz. Fuente: (Camargo, *et al*. Panamá, 2014)

Por su parte, una etapa fenológica está delimitada por cambios fisiológicos y morfológicos en el crecimiento de la planta, a cada etapa se le ha asignado un número y un nombre. Dentro de ciertas etapas se presentan periodos críticos, que son el intervalo breve durante el cual la planta presenta la máxima sensibilidad a determinado elemento, de manera que la oscilación en los valores de este fenómeno se reflejan en el rendimiento del cultivo; estos periodos críticos se presentan, generalmente, poco antes o después de las fases, durante dos o tres semanas. Las etapas del crecimiento y desarrollo de la planta de arroz corresponden a la *germinación*, *plántula*, *macollamiento* y *máximo macollamiento*, *formación del primordio floral* (diferenciación de la panícula), *elongación del tallo*, *desarrollo de la panícula*, *floración*, estado de *grano lechoso*, estado de *grano pastoso* y *maduración*.

## **1.2. Patógenos de importancia en cultivo de arroz**

Las enfermedades son una de las limitantes al aumento de la productividad de arroz en los trópicos, restringen la expansión de las áreas de cultivo y aumentan los costos por insumos en el sembrado. Aunque el arroz crece en amplio rango de condiciones - incluyendo planicies altas secas los agroecosistemas de arroz más productivos son las planicies bajas irrigadas, el resultado final es que las zonas más productivas son también las más vulnerables a las pérdidas causadas por roedores, insectos, hongos, bacterias y virus. (Barrera, 2015)



Su cultivo intensivo es afectado por numerosos factores bióticos, destacándose particularmente los agentes infecciosos, incluyendo virus, bacterias y hongos, así como plagas por diversas especies de artrópodos.

Entre las principales enfermedades del este cultivo en Panamá tenemos las causadas por agentes patógenos como la *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia spp*, Virus de la hoja blanca, *Helmintosporium spp*, *Rhinchosporium spp*, *Cercospora spp*, *Sarocladium spp*. Además de las enfermedades provocadas por bacterias como la *Xanthomonas spp*, *Pseudomonas spp* y *Burkholderia spp* (MIDA, 2015)

### **1.3. *Burkholderia glumae* patógeno del cultivo de arroz**

*B. glumae* es una bacteria Gram negativa y aerobia, causante de la enfermedad conocida como añublo bacterial de la panícula en la planta de arroz (Tabla 1). Entre sus propiedades microbiológicas se encuentra que es multiflagelada (de 2 o más pares de flagelos) y encapsulada. Metabólicamente es capaz de reducir el nitrato, hidrolizar la gelatina, degradar el almidón y degradar la pectina, además es H<sub>2</sub>S negativo. Es capaz de producir ácido a partir de diferentes carbohidratos como arabinosa, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, xilosa, glicerol, manitol e inositol; es ácido negativo para ramnosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa, dextrina, almidón y salicina.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Burkholderia glumae*

<i>Reino</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Filo</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Clase</i>	<i>Beta Proteobacteria</i>
<i>Orden</i>	<i>Burkholderiales</i>
<i>Familia</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
<i>Genero</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Especie</i>	<b><i>Burkholderia glumae</i></b>

Nota. Fuente: Pedraza, 2012.

Una característica importante de la bacteria es que produce pigmentos difusibles en agar King B, esto es importante para el reconocimiento de la bacteria ya que inicialmente se creía que la producción de este pigmento estaba relacionada con la fluoresceína, una sustancia fluorescente producida por el género *Pseudomonas spp.*, aunque posteriormente se demostró que está relacionado con la presencia de la toxina producida por *B. glumae*, la toxoflavina.

La temperatura de crecimiento óptimo de la bacteria está entre 30°C y 35°C, aunque tiene un rango límite de crecimiento entre 11°C Y 40°C. La toxoflavina se sintetiza entre temperaturas de 30 °C y 37 °C, por lo que se considera que a estas temperaturas la bacteria es más patógena.

### **1.3.1. El añublo bacterial de la panícula de arroz**

Esta enfermedad ha sido un gran problema a nivel mundial debido a que se ha extendido rápidamente y ha provocado grandes pérdidas en la producción de arroz. La enfermedad se reportó por primera vez en Japón en 1967 y posteriormente en otras regiones de Asia como Corea y Taiwán. En 2005 se reportó en los Estados Unidos, causando grandes pérdidas principalmente en el estado de Luisiana, en 2006 se reportó en Panamá y en 2007 en Colombia, causando pérdidas principalmente en el departamento de Córdoba.

Dentro de las especies del género *Burkholderia* se incluye *B. gladioli*, también responsable del añublo bacterial de la panícula. Sin embargo, esta bacteria suele ser aislada con menor frecuencia en plantas de arroz infectadas y es menos virulenta en comparación con *B. glumae* (Pedraza, 2012).

### **1.3.2. Síntomas del añublo bacterial de la panícula del arroz**

La enfermedad presenta varios síntomas como la decoloración y pudrición de varias partes de la planta y se presenta de diferente manera dependiendo del órgano de la planta infectado, los síntomas se presentan a nivel de cuatro órganos en la planta: la plántula, la vaina, las hojas y la panícula, donde también se ve afectada la semilla.

Estudios realizados por el CIAT Colombia (2010), demostraron que cuando la bacteria es inoculada en la plántula los síntomas que genera están a nivel de plántula y vaina causando principalmente decoloración de la vaina y pudrición de la vaina y la plántula; también se presentaba una brotación pobre en los esquejes cuando se induce el crecimiento, además presenta exudados en las partes jóvenes de los tallos.

Los síntomas en cultivos infectados en campos ya establecidos son diferentes, observándose decoloración de la vaina, especialmente en la hoja bandera; marchitez de las hojas infectadas y sanas debido a obstrucción vascular y presenta exudado bacteriano a lo largo del tallo. Los síntomas más notorios de la enfermedad del añublo bacterial se ven en la panícula y semillas de la planta. A nivel de la panícula se presenta decoloración, manchado y vaneamiento; el manchado café de la panícula y semilla es el síntoma característico de la enfermedad (Pedraza, 2012).

#### 1.4. *Magnaporthe oryzae* (Anamorfo *Pyricularia oryzae*) patógeno del cultivo de arroz

*P. oryzae* es un hongo microscópico, perteneciente al grupo de los ascomicetos, causante de la piriculariosis o tizón de la panícula del arroz (Tabla 2).

**Tabla 2.** Taxonomía de *Pyricularia oryzae*

<b>Reino</b>	<b>Fungi</b>
<b>Phylum</b>	Ascomycota
<b>División</b>	Eumycota
<b>Subdivisión</b>	Ascomycotina
<b>Clase</b>	Pyrenomycetes
<b>Subclase</b>	Pterygota
<b>Orden</b>	Magnaporthales
<b>Familia</b>	Magnaporthaceae
<b>Género</b>	Magnaporthe
<b>Especie</b>	<i>Magnaporthe grisea</i> (T.T. Hebert) M.E. Barr.

#### Sinónimos:

*Ceratosphaeria grisea* T.T. Hebert, (1971)  
*Dactylaria grisea* (Cooke) Shirai, (1910)  
*Dactylaria oryzae* (Cavara) Sawada, (1917)  
*Phragmoportha grisea* (T.T. Hebert) M.  
 Monod, (1983)  
*Pyricularia grisea* Sacc., (1880) (anamorfo)  
*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., (1880)  
*Pyricularia oryzae* Cavara, (1891)  
*Trichothecium griseum* Cooke,  
*Trichothecium griseum* Speg., (1882)

Nota. Fuente: APROSCELLO, 2013.

*P. oryzae* posee conidióforos generalmente epífitos, con el extremo redondeado, algo estrecho en la base, septados hacia su parte inferior y muy poco o no septados hacia arriba, coloración grisácea; conidios obclavados o piriformes, aguzados en el extremo y con base truncada o presentando un pequeño apéndice casi siempre con 2 septos, ligeramente oscuros, translúcidos; más de un conidio puede formarse sobre el conidióforo; el número de conidio oscila entre 1 y 20. El tamaño de los conidios varía según los diferentes organismos aislados y según las condiciones ambientales (Barrera, 2015)

El conidio forma apresorios en el extremo del tubo germinativo, los cuales varían la forma y tamaño, y tienen generalmente paredes delgadas con un diámetro entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , globosos, ovoides u oblongo. La temperatura óptima para el crecimiento del micelio es de 28 °C aproximadamente, aunque este puede crecer a temperaturas de 8 hasta 37 °C, con un óptimo de 28 °C. La temperatura óptima para la germinación del conidio oscila entre 25 y 28 °C, los conidios se forman sobre las lesiones en la planta de arroz solo cuando la humedad relativa del aire oscila entre 92 y 96%. El micelio crece mejor cuando hay un 93% de humedad del aire. La luminosidad influye de forma variable sobre la actividad fisiológica del hongo. La esporulación es estimulada por periodos alternos de luz y oscuridad y la diseminación de los conidios ocurre mayormente durante la noche. El crecimiento del micelio aumenta con la disminución de la luz, la luz solar suprime la germinación del conidio. El nombre del estado anamorfo *P. oryzae* se ha usado para el hongo que aparece en el arroz, diferenciándolo de *P. grisea* que se encuentra en otros cereales y gramíneas (Aproscello, 2013).

#### **1.4.1. Piriculariosis (tizón o quemazón) del arroz**

Fue reportada por primera vez en Japón 1704, en general, se distinguen dos períodos críticos en los cuales las plantas de arroz son más susceptibles: 35-40 días de edad del cultivo y en floración (Barrera, 2015).

El hongo *Pyricularia oryzae* tiene un ciclo de vida corto en la planta y por tanto múltiples infecciones se pueden llevar a cabo en un campo infectado por este patógeno. El hongo penetra por la hoja gracias a una estructura de forma semiesférica denominada apresorio. Debido a una gran presión (aproximadamente 8 Mpa) ejercida sobre la superficie de la hoja, el hongo es capaz de penetrar en la planta. Una vez dentro crece de una manera biotrófica, es decir, sin afectar demasiado al crecimiento de la planta y sin matar a las células vegetales. Al cabo de unos tres días los efectos del hongo sobre la hoja comienzan a ser visibles y a generar lesiones debido a la necrosis o muerte de las células de la hoja. En ese punto, realmente podemos decir que el hongo empieza a matar a la planta y se alimenta de los restos de las células vegetales muertas (Rodríguez, 2016).

Este estadio de crecimiento se denomina necrotrófico. Finalmente a los seis o siete días, el hongo emerge del tejido vegetal y de cada lesión se generan miles de esporas al día durante dos semanas. Las esporas se diseminan por viento o agua y están listas para iniciar un nuevo ciclo de infección. Durante todo este proceso se produce una merma importante en el cultivo pudiendo afectar severamente la producción de los granos de arroz.

Dependiendo en la época o parte de la planta donde se produce el ataque, la severidad puede ser variable. Las lesiones que produce el hongo en las hojas son de forma alargada, de color marrón uniforme. Más adelante presenta centros grisáceos y bordes de color marrón. También puede producir daños en los nudos, en diferentes partes de la panícula y en los granos. En muchas ocasiones, los granos terminan vacíos o deficientemente llenos y grisáceos.

Los ataques en la panícula son los más importantes puesto que la rentabilidad de la inversión requerida para la explotación de este cereal tiende a reducirse sustancialmente por la baja en la calidad y cantidad de la cosecha. No obstante, las mermas por infecciones foliares pueden incidir en los rendimientos, debido a que los daños provocan reducciones tanto en el número de macollas como en la altura de las plantas, llegando inclusive hasta la muerte parcial o total de las mismas. Como consecuencia de esta reducción del área foliar, se crean condiciones propicias para la invasión violenta de malezas que compiten con el cultivo (Barrera, 2015). Dependiendo de la variedad y las condiciones predisponentes, las pérdidas ocasionadas por la infección pueden llegar a reducir en más de un 65% los rendimientos en la producción de granos de arroz (Rodríguez, 2016).



## **2. EL SUELO Y LOS MICROORGANISMOS**

En su significado tradicional “El Suelo” se define como el medio natural para el crecimiento de las plantas (FAO, 2018).

El suelo es un recurso viviente y dinámico que condiciona la producción de alimento, su calidad tiene un papel fundamental en el mantenimiento del balance entre producción y consumo de dióxido de carbono en la biosfera. El suelo no sólo es la base para la agricultura, sino que de él depende toda la vida del planeta. La mayor parte de las etapas de los ciclos biogeoquímicos tienen lugar en él (García, 2011).

Por su parte, los microorganismos, también llamados microbios u organismos microscópicos, son seres vivos que sólo puede visualizarse con el microscopio. La ciencia que estudia a los microorganismos es la Microbiología. «Micro» del griego (diminuto, pequeño) y «bio» del griego (vida) seres vivos diminutos. Son organismos dotados de individualidad que presentan, a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental (EcuRed, 2010).

El suelo constituye el sustrato en el que la mayor variedad de microorganismos se pueda encontrar. Esto se justifica por la presencia de elevadas concentraciones de nutrientes que existen en él (Tejera *et al*, 2011).

## **2.1. Hongos de suelo**

Conforman una importante fracción de la biomasa total microbiana del suelo. Crecen en forma de red extendiéndose como micelio hasta su estado reproductivo donde dan origen a esporas sexuales o asexuales. Son importantes degradadores aerobios de material vegetal en descomposición en suelos ácidos. Producen enzimas y metabolitos que contribuyen al ablandamiento y a la transformación de sustancias orgánicas. También estas enzimas forman parte de la actividad de otros microorganismos. Su crecimiento ramificado rápido y la intensa actividad degradadora les permiten mantener un equilibrio en los ecosistemas del suelo (Lizarro y Restrepo, 2014).

Las raíces de las plantas están pobladas de hongos que aprovechan las exudaciones radiculares constituidas por azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, enzimas, vitaminas y sustancias promotoras de crecimiento. Los hongos movilizan nutrientes minerales hacia las raíces de las plantas, aumentan la capacidad de retener agua en sequía, fijan nitrógeno y fósforo y protegen las raíces de fitopatógenos por espacio y emitiendo sustancias que los inhiben. Los hongos son muy activos en las plantas y prefieren los azúcares que estas segregan por las raíces.

Algunos hongos entran en simbiosis con las raíces llamadas micorrizas. Son más activos en suelos arenosos y pobres en materia orgánica. La simbiosis se ve favorecida por la pobreza mineral del suelo.

Los géneros de hongos más importantes asociados a las raíces de las plantas son *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Rhizopus spp* y *Trichoderma spp*. El *Aspergillus spp* y el *Penicillium spp* movilizan el fósforo y el nitrógeno del suelo. El *Trichoderma spp* sostiene la humedad en las raíces en condiciones de sequía (Lizarro y Restrepo, 2014).

## **2.2. Bacterias de suelo**

Son los microorganismos más abundantes y pequeños (0.1 a 1 micras). Pueden ser aerobias (crecen con oxígeno), anaerobias (crecen sin oxígeno) o facultativas (crecen con o sin oxígeno). Pueden tolerar pH ácido (acidófilas), pH básico (basófilas) o pH neutro (neutrófilas). En suelos ácidos algunas bacterias neutrófilas tienen la capacidad de neutralizar el suelo donde se están desarrollando para cumplir su función.

Si las bacterias se alimentan de compuestos orgánicos son heterótrofas. Si se alimentan de inorgánicos, son autótrofas. Las que se desarrollan a temperaturas medias (15 a 40 °C) son mesófilas, a temperaturas menores a 15 °C son psicrofílicas y a temperaturas mayores a 40 °C son termófilas. La mayoría de las bacterias del suelo que son importantes para las plantas son heterótrofas, aerobias y mesófilas (Lizarro y Restrepo, 2014).

Su capacidad de multiplicación les permite crear poblaciones muy grandes en un tiempo muy corto, colonizando rápidamente los sustratos a degradar. La clase y abundancia de bacterias presentes en una fracción de suelo dependen de los sustratos que la compongan y de sus condiciones (suelo ácido, con materia orgánica alta, anegado, de sabana, etc).

Las bacterias tienen especial importancia en la relación suelo-planta y son responsables del incremento o disminución en el suministro de nutrientes.

Los suelos agrícolas que están sometidos a la mecanización continua, al monocultivo, al riego, a la aplicación de agroquímicos y fertilizantes de síntesis, a la compactación y a las quemadas, tienen una flora microbiana muy baja que afecta su fertilidad. Las bacterias benéficas del suelo son indispensables para recuperar la estructura perdida por las prácticas agrícolas, para hacer disponibles los nutrientes que hay en el suelo y para incorporarle la materia orgánica que necesita para mejorar la fertilidad (Lizarro y Restrepo, 2014).

Entre los géneros bacterianos más importantes agrícolamente por la transformación de los compuestos orgánicos e inorgánicos y que favorecen la nutrición de las plantas están: *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Azotobacter spp*, *Azospirillum spp*, *Beijerinckia spp*, *Nitrosomonas spp*, *Nitrobacter spp*, *Clostridium spp*, *Thiobacillus spp*, *Lactobacillus spp*, y *Rhizobium spp*.

### **2.3. Importancia de los microorganismos del suelo**

La actividad microbiana del suelo (o edáfica) da cuenta de las reacciones bioquímicas que se suceden dentro de este complejo y heterogéneo sistema (García, 2011).

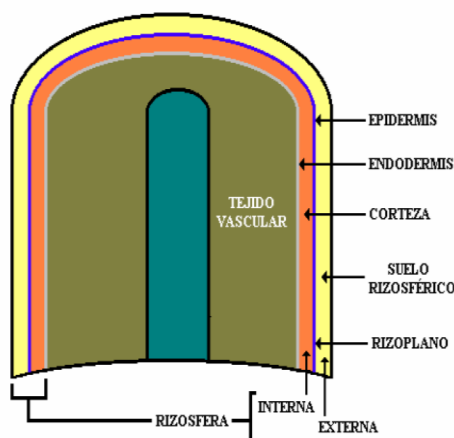
Los microorganismos del suelo, aparte de suministrarle una buena cantidad de biomasa al mismo y de causar, en algunos casos, problemas fitosanitarios en los cultivos, intervienen activa y directamente en ciclos geoquímicos como el del C, N, P y S, que son los más conocidos. También toman parte en una buena cantidad de procesos y reacciones que tienen que ver con la nutrición vegetal. Ciertos microorganismos pueden asociarse con plantas mejorando su nutrición, como en los casos de las micorrizas y de la fijación biológica de nitrógeno, los cuales son los casos más conocidos y estudiados hasta el momento (Jaramillo, 2002).

### **3. LA RIZÓSFERA**

Las raíces de las plantas viven todo el tiempo en estrecha asociación con los organismos del suelo, en condiciones normales de crecimiento. Esta asociación se conoce como **rizocenosis** y se lleva a cabo en la rizósfera.

La rizósfera es la zona del suelo adyacente a la raíz que está bajo la influencia de su actividad, diferenciando tres partes en ella (Jaramillo, 2002) (Figura 2).

- **Endorizosfera** o rizósfera interna, que comprende la corteza de la raíz, es decir, el tejido que se encuentra entre la endodermis y la epidermis.
- **Rizoplano**, que es la superficie de la raíz.
- **Exorizosfera** o rizósfera externa, que es el suelo que está en íntimo contacto con la superficie de la raíz y que por ello es llamado también suelo rizosférico.



*Figura 2.* Secciones de la rizósfera. (Jaramillo, 2002).

### 3.1 Interacción rizósfera –microorganismos

La rizósfera, gracias a su ambiente rico en energía y nutrientes, alberga grandes poblaciones de la mayor parte de los grupos de microorganismos del suelo; presenta una alta población de bacterias, así como la mayor parte de los protozoarios y de los nematodos de vida libre del suelo (Jaramillo, 2002).

Los principales grupos de microorganismos son 10 a 100 veces más abundantes en la rizósfera que en el suelo adyacente, debido a que las sustancias que se producen en ella estimulan su crecimiento. Este autor puntualiza que:

- En la rizósfera se presenta una gran cantidad de bacterias amonificantes, estimuladas por la presencia de nitrógeno orgánico.
- La fijación de  $N_2$  por bacterias libres es mayor en la rizósfera de plantas no leguminosas que en el suelo adyacente.
- Algunas estructuras de hongos son estimuladas a germinar por las excreciones radiculares.
- Algunos exudados y/o secreciones de la raíz de ciertas plantas tienen efectos alelopáticos pero también este efecto puede ser producido por microorganismos de la rizósfera que alteran los exudados y forman compuestos tóxicos.
- La microflora de la rizósfera protege la raíz contra patógenos del suelo y produce cantidades considerables de sustancias estimulantes del crecimiento vegetal como ácido indolacético, giberelinas y citocininas.

#### 4. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PATÓGENOS

El Control Biológico en su definición más sencilla, significa “la regulación de un organismo como consecuencia de la actividad de otro, lográndose con ello un equilibrio poblacional” (Espinosa, 2014)

Cuando se utilizan microorganismos como agente patogénico o controlador, nos refiriéndonos entonces a un control microbiológico de agentes patógenos. Si bien existen referencias a lo largo de la historia sobre su uso, ha sido en los últimos 30 años que este tipo de estrategia ha cobrado relevancia.

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Fernández, 2001).

En las últimas décadas, se ha descrito el efecto que ejerce una gran diversidad de microorganismos rizosféricos en el control de organismos fitopatógeno, ya que la rizósfera representa la primera línea de defensa de la planta contra organismos fitopatógeno edáficos, evitando así el establecimiento de éstos en la raíz (Villa *et al*, 2017).

Una gran diversidad de especies del género *Bacillus spp.* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros (Villa *et al*, 2017).



El estudio de esta capacidad de *Bacillus* se inició por el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; en la actualidad diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola.

#### **4.1 Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas.**

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. COLECTA DE CAMPO

La colecta de las muestras se realizó en la localidad de Los Alvéos, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá, próximo a las coordenadas UTM (Datum WGS84) 591361.06 m E; 943492.23 m N. La mayoría de los productores de arroz de esta zona, se dedican a la agricultura de subsistencia, bajo la modalidad de cultivos orgánicos, asesorados por el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (Yau, comunicación oral, 2016). El cultivo no presentó enfermedades de importancia agrícola durante los ciclos de muestreo.

En campo se tomaron muestras de suelo para su análisis fisicoquímico en el Laboratorio de Suelos del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. El muestreo se efectuó en una parcela de 10 m<sup>2</sup> (Figura 3) cultivada con arroz, variedad **Gab 8** (Tabla 3), bajo el sistema de agricultura de subsistencia.



**Figura 3.** Parcela experimental. Parcela sembrada con arroz, muestreada en tres fases fonológicas del cultivo, durante dos ciclos de producción.

**Tabla 3.** Descripción de la variedad de arroz GAB 8

Nombre	Origen	Liberación	Instituciones	Rango ciclo	Rango altura	Rendimiento
IDIAP GAB 8	CIAT: HI 85B 6588	2010	IDIAP-CIAT-AGROSALUD	100-117 dds	100-106 cm	20-70 qq/ha

Reacción a enfermedades	susceptible	Contenido de hierro	Contenido de zinc	Calidad molinera	Adaptación
Tolerante Pyricularia	manchado del grano	3.6 mg/kg	14.595 mg/kg	Buena	Agricultura familiar (chuzo y fanguero)

*Nota:* Tomado de Compendio Las variedades mejoradas de arroz del IDIAP, Camargo (2012).

El sitio de muestreo fue seleccionado para la bioprospección de microorganismos debido a que no estaba sometido a los efectos de los agroquímicos (MIDA, agencia de Antón, provincia de Coclé, comunicación oral).

En esta región la siembra de arroz se da en dos períodos durante el año (abril o mayo y agosto o septiembre); por ello la toma de las plantas de arroz se realizó en dos ciclos del cultivo, siguiendo las fases fenológicas del mismo (*fase vegetativa, fase de floración y fase de maduración*). Para el primer ciclo se muestreó durante el período de tiempo comprendido entre agosto y diciembre del año 2016 y para el segundo ciclo, durante mayo a septiembre del año 2017 (tabla 4).

**Tabla 4.** Descripción de los muestreos por fases fenológicas y ciclo del cultivo

	Nº de Muestreo	Fase Fenológica	Día de muestreo (DDS)	Cantidad de plantas tomadas
<b>PRIMER CICLO</b> <i>agosto-diciembre 2016</i>	1	Vegetativa	15 DDS	3
	2	Floración	50 DDS	3
	3	Maduración	90 DDS	3
<b>SEGUNDO CICLO</b> <i>mayo-septiembre 2017</i>	4	Vegetativa	15 DDS	3
	5	Floración	50 DDS	3
	6	Maduración	90 DDS	3
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>			<b>18</b>

*Nota.* DDS (días después de la siembra).

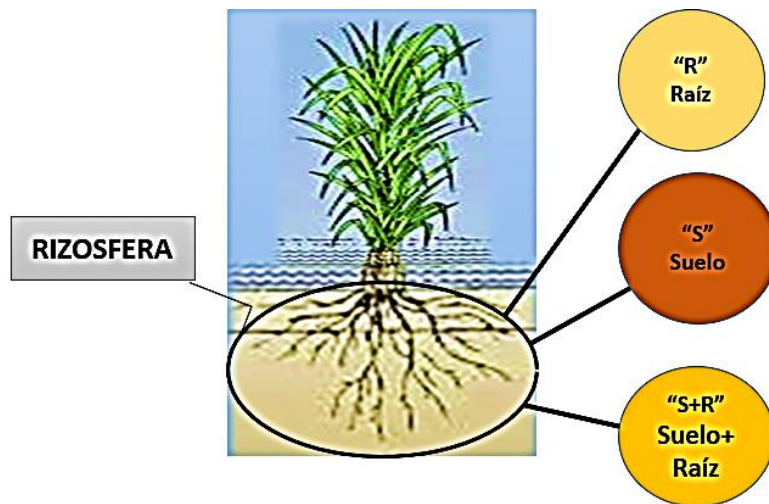
Se utilizó el método aleatorio simple para la toma de muestras, recorriendo la parcela en zigzag y extrayendo las plantas a 20 cm de profundidad. Se tomaron tres plantas por muestreo (por fase fenológica) colocándolas en bolsas plástica para trasladarlas al laboratorio y procesarlas en 24h.

## 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

En esta etapa se procesaron las muestras de la rizósfera de las plantas de arroz, aislando microorganismos autóctonos (hongos y bacterias); se evaluó *in vitro* el potencial antagónico de los aislamientos microbianos ante las cepas de los fitopatógeno *Burkholderia glumae* y *Pyricularia oryzae* (cepas suministradas por el doctor Luis Mejía, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología AIP, respectivamente).

Se identificaron las cepas con mayor potencial de inhibición y se realizó la conservación criogénica de estos. Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé-Universidad de Panamá

De cada una de las plantas colectadas se separó la parte aérea de la basal; la zona rizosférica fue dividida en tres secciones (Figura 4 y 5), **la exorrizosfera** o suelo rizosférico que representamos con la letra “S”, **la raíz** que involucra tanto la endorizosfera y rizoplano, representada con la letra “R” y **una mezcla de suelo rizosférico con raíces** “S+R”.



**Figura 4.** Secciones de la rizosférica del arroz procesadas. Para la bioprospección de microorganismos la rizosfera fue separada en tres secciones “R-Raíz”, “S-Suelo” y “S+R-Suelo+Raíz”



**Figura 5.** Separando las secciones de la rizosfera de arroz.

De cada sección se pesaron 30 g de la muestra, para luego homogenizarlas en 100 ml de agua peptonada. Las suspensiones fueron colocadas en un homogenizador seward® (Figura 6) a 200 RPM por 1 min, luego de 5 min se inocularon en platos Petri.



**Figura 6.** Proceso de homogenización de las secciones de la rizósfera

### **3. AISLAMIENTO, PRUEBAS DE ANTAGONISMO *IN VITRO* E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS DEL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)**



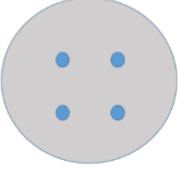

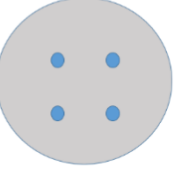

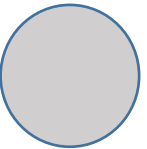
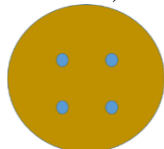

#### **3.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas.**

Se aplicó la metodología de Benítez y colaboradores (2007), mediante diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  a partir de los 30 g tomados de cada una de las secciones de la rizósfera (homogenizadas en agua peptonada). Se agregaron 0.7 ml de cada dilución en platos Petri con agar tripticasa soya (TSA) Alpha Biosciences® y se esparcieron por agotamiento, incubándose a 28°C durante 24 h. Luego de la incubación se realizó el recuento de las colonias bacterianas, se seleccionaron entre 2 a 3 colonias por réplica en cada dilución.

#### **3.2. Pruebas de antagonismo *in vitro* de las bacterias rizosféricas ante el fitopatógeno *Burkholderia glumae*.**

Las pruebas de antagonismo consistieron en enfrentamientos duales (Tabla 5) entre los microorganismos autóctonos aislados de la rizósfera y los fitopatógenos *B. glumae* y *P. oryzae*, con la finalidad de observar y cuantificar la posible inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos por efecto de la presencia de los microorganismos autóctonos aislados.

**Tabla 5.** Esquema de las pruebas de antagonismo in vitro entre las bacterias aisladas y *B.glumae*

Enfrentamientos				
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Controles	Observación
 <p></p> <p><i>B.glumae</i> difusa en medio TSA</p> <p>Bacterias aisladas de la rizósfera</p>	 <p></p> <p><i>B.glumae</i> difusa en medio TSA</p> <p>Bacterias aisladas de la rizósfera</p>	 <p></p> <p><i>B.glumae</i> difusa en medio TSA</p> <p>Bacterias aisladas de la rizósfera</p>	<p><b>Control 1</b></p> <p>Se coloca 1 ml de <i>B.glumae</i> en el plato Petri y luego se agrega agar TSA homogeneizando y dejando solidificar.</p>  <p><i>B.glumae</i> difusa en medio TSA</p>	<p>Los tratamientos se incubaron a temperatura ambiente.</p> <p>La evaluación se hizo por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de la gota radial (mm), el día 2, 5 y 8 luego de la inoculación.</p> <p>La sola presencia de halos de inhibición alrededor de la gota será considerada como una respuesta cualitativa antagónica entre cepas.</p> <p>Para el cálculo del potencial antagonista, se mide el diámetro del halo de inhibición y se resta del diámetro de la colonia de la bacteria.</p>
<p><b>Método: difusión en agar</b></p> <p>-Se coloca 1 mililitro de <i>B.glumae</i> en el plato Petri</p> <p>-Se agrega agar TSA homogeneizando y dejando solidificar.</p> <p>-Luego de solidificado se divide en 4 secciones, colocando en cada sección una gota (tres micro litros) de la bacteria aislada y previamente revivificada (una bacteria distinta en cada sección).</p>			<p><b>Control 2</b></p> <p>En un plato Petri con medio TSA, se colocan 3 µl de las soluciones bacteriana con las que se trabajan (una bacteria en cada sección).</p>  <p></p> <p>Plato Petri con medio TSA</p> <p>Bacterias aisladas de la rizósfera</p>	



Para el caso de las bacterias, la prueba de antagonismo *in vitro* consistió en enfrentamientos duales entre la cepa de ***B.glumae*** y las bacterias aisladas de la rizósfera. Para ello, se agregó en matraces de vidrio 20 ml de agua peptonada, seguidamente se inoculó un matraz con la bacteria fitopatógena y los demás con bacterias rizosféricas, sellando la boca de los matraces con tapones de algodón para facilitar la entrada de oxígeno al medio, dejando en agitación y temperatura constante durante 24 h (Alvis *et al.* 2017).

Luego de 24 h y siguiendo la metodología básica del ensayo de difusión en agar planteado por Cristancho y Agudelo (2009), se colocó 1 ml de la suspensión de ***B.glumae*** en un plato Petri, seguidamente se agregaron 10 ml de agar TSA a una temperatura entre 28 a 32 °C. Luego de solidificado se trazaron líneas sobre la placa Petri, a fin de dividirla en cuatro secciones, sobre las cuales se colocaron gotas de 3 µL (8 mm de diámetro) de las suspensiones con las bacterias aisladas, una cepa bacteriana distinta en cada sección, los tratamientos se hicieron por triplicado, incubando durante 24 h en oscuridad a 28°C.

Se realizaron observaciones del crecimiento y formación de halos de inhibición sobre el medio inoculado con ***B.glumae*** el segundo, quinto y octavo día posterior al montaje de los tratamientos; midiendo el diámetro (mm) de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de la gota de las cepas bacterianas. La presencia de halos de inhibición en dos de las tres réplicas fue considerada como una respuesta cualitativa antagónica entre cepas (Cristancho y Agudelo, 2009). Se calculó el potencial antagonista, sustrayendo el diámetro del halo de inhibición del diámetro de la colonia del posible antagonista (Astorga *et al.*, 2013). Halos de inhibición  $\geq$  a 4 mm de diámetro, fueron considerados como antagonistas significativos para los patógenos evaluados.

### **3.3. Identificación de bacterias con actividad antagónica**

La identificación de las bacterias con capacidad antagónica frente a *B.glumae*, fue considerada a partir de la diferenciación, empleando la Tinción de Gram. Se utilizó el sistema de identificación bioquímica API Biomereux®.

Se consideró como antagonista significativo, aquellas cepas con halo de inhibición  $\geq$  a 4mm de diámetro. De las que presentaron mayor halo de inhibición, se seleccionaron 10 para su identificación bioquímica. Es importante indicar que la cepas bacterianas reactivadas en agua peptonada fueron sembradas cinco días antes por estrías en medio TSA, verificando las características de la colonia y su pureza. Se utilizó una galería de láminas API 20 E y uno de API 50 CH para cada cepa seleccionada, siguiendo las instrucciones del manual Biomereux®.

### **3.4. Cinética de crecimiento bacteriano**

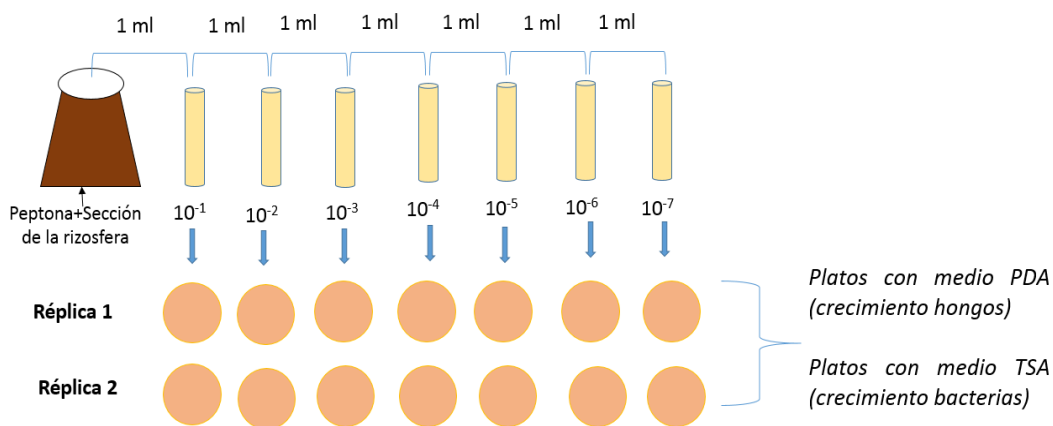
De las bacterias que presentaron halo de inhibición  $\geq$  a 4 mm, se seleccionaron al azar 2, para realizar las pruebas de cinética de crecimiento microbiano, con el objetivo de relacionar la actividad antagónica con la velocidad de duplicación tanto del patógeno como del posible antagonista. Se colocaron las cepas bacterianas en matraces de vidrio con 20 ml de agua peptonada, dejándolas en agitación por 18 h a 28 °C.

Se determinó la densidad óptica de crecimiento de cada cepa incluyendo la *B.glumae*, en un espectrofotómetro ( $\lambda$  600 nm). La absorbancia se midió cada 30 minutos durante un período de 9 h. Los datos fueron graficados formando la curva de crecimiento de cada bacteria.

#### 4. AISLAMIENTO, PRUEBAS DE ANTAGONISMO *IN VITRO* E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS RIZOSFÉRICOS DEL CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*)

##### 4.1. Aislamiento de hongos rizosféricos

Se realizaron diluciones seriadas (Figura 7) a partir de la muestra de 30 g tomados de cada una de las secciones de la rizósfera. La siembra se realizó por duplicado (Tabla 6), incubando a temperatura ambiente alternando 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Chaves, comunicación oral, 2016).



**Figura 7.** Diagrama de dilución seriada.

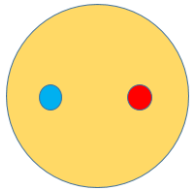
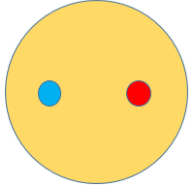
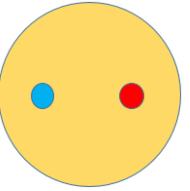
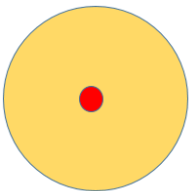





**Tabla 6.** Aislamientos de bacterias y hongos rizosféricos por fases fenológicas, durante dos ciclos del cultivo

CICLO DE CULTIVO	MUESTREO	FASE FENOLOGICA	SECCIÓN DE LA RIZÓSFERA	DILUCIONES POR TRATAMIENTO	NÚMERO DE RÉPLICAS	MEDIO DE CULTIVO
<b>PRIMER CICLO (septiembre-diciembre 2016)</b>	1	fase vegetativa	1. Suelo	7	2	TSA -PDA
			2. Suelo + raíz	7	2	TSA -PDA
			3. Raíz	7	2	TSA -PDA
	2	fase reproductiva	1. Suelo	7	2	TSA -PDA
			2. Suelo + raíz	7	2	TSA -PDA
			3. Raíz	7	2	TSA -PDA
	3	fase de maduración	1. Suelo	7	2	TSA -PDA
			2. Suelo + raíz	7	2	TSA -PDA
			3. Raíz	7	2	TSA -PDA
<b>SEGUNDO CICLO (mayo-septiembre 2017)</b>	4	fase vegetativa	1. Suelo	7	2	TSA -PDA
			2. Suelo + raíz	7	2	TSA -PDA
			3. Raíz	7	2	TSA -PDA
	5	fase reproductiva	1. Suelo	7	2	TSA -PDA
			2. Suelo + raíz	7	2	TSA -PDA
			3. Raíz	7	2	TSA -PDA
	6	fase de maduración	1. Suelo	7	2	TSA -PDA
			2. Suelo + raíz	7	2	TSA -PDA
			3. Raíz	7	2	TSA -PDA

#### **4.2. Pruebas de antagonismo *in vitro* de los hongos aislados de la rizósfera frente *Pyricularia oryzae*.**

Las cepas fúngicas aisladas de la rizósfera clasificadas por género y morfotipos, fueron repicadas en platos Petri con medio PDA e incubadas durante siete días, a 28 °C, alternando 18 horas de luz y seis de oscuridad (Chaves, comunicación oral, 2016). Seguidamente, se empleó el método de cultivo dual (Quirós *et al.* 2014 y Castellano, 2012); se colocó un disco de 7 mm de diámetro colonizado con cada uno de los hongos rizosféricos aislados e identificados. En sentido opuesto a 15 mm del centro del plato, se colocó un disco colonizado de 7 mm con el patógeno *P. oryzae.*, para cada cepa fúngica se hicieron 3 réplicas. Para el caso del primer control se colocó un disco del patógeno en el centro del plato con PDA y para el segundo, se colocó un disco (7 mm) del hongo aislado en PDA, con el fin de determinar el crecimiento sin competencia (Tabla 7).

**Tabla 7.** Esquema de las pruebas de antagonismo in vitro entre las cepas fúngicas aisladas y *P. oryzae*.

Enfrentamientos				
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Controles	Observación
 <p>Plato Petri con medio PDA</p> <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera</p> <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	 <p>Plato Petri con medio PDA</p> <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera</p> <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	 <p>Plato Petri con medio PDA</p> <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera</p> <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	<p><b>Control 1</b></p>  <p>Se colocó un disco de 5mm del fitopatógeno <i>P.oryzae</i> en un plato Petri con medio PDA.</p>  <p>Plato Petri con medio PDA</p>  <p>Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i></p>	<p>Se marca una línea divisoria (centro del plato Petri), para observar la invasión del espacio de cada microorganismo.</p> <p>Se tomará la medida del crecimiento micelial del patógeno <i>Pyricularia</i> y se calcula el porcentaje de inhibición con la formula</p> $PICR = \frac{R1 - R2}{100} \cdot R1$ <p>Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).</p>
<p><b>Método: Cultivo dual</b></p> <p>-En PDA, se sembrará un disco (5 mm) del hongo aislado a 15 mm del centro del plato,</p> <p>-En el sentido opuesto también a 15 mm del centro, se colocará un disco de 5 mm de diámetro del patógeno <i>Pyricularia</i>.</p>			<p><b>Control 2</b></p>  <p>Se colocó un disco de 5mm de la cepa fúngica aislada de la Rizósfera en un plato Petri con medio PDA.</p>  <p>Plato Petri con medio PDA</p>  <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera.</p>	<p>Los tratamientos se incuban a temperatura ambiente. Las mediciones se realizan los días 3, 5 y 8 posterior al montaje de los enfrentamientos.</p>

Las mediciones a considerar, se tomaron en cuenta a partir del tercer, quinto y octavo día posterior a la siembra, calculando el índice de inhibición, mediante la fórmula

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$$

*R1*

*Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual). (Quirós, et al., 2014)*

El criterio seleccionado para determinar el potencial antagónico según el porcentaje de inhibición fue tomado según la metodología propuesta por Benitez *et al*, (2007), así:

**Negativo:** ausencia de zona de inhibición o un porcentaje menor de 10% y crecimiento normal de la colonia fúngica, de forma similar al control.

**Baja:** ausencia de zona de inhibición o con un porcentaje entre 10–39% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

**Media:** ausencia de zona de inhibición o un porcentaje entre de 40–69% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

**Positivo:** presencia de zona de inhibición definida o en un porcentaje entre 70–100%.

Los hongos que fueron identificados se criopreservaron en glicerol al 30% y posteriormente fueron ultracongelados a -80 °C.

#### 4.3. Identificación de hongos con actividad antagónica

Las cepas fúngicas con características macroscópicas similares se agruparon en morfotipos para su identificación taxonómica, se empleó la técnica de microcultivo en cámara húmeda incubando a 28 °C, alternando 16 h de luz y 8 h de oscuridad, para favorecer el crecimiento de estructuras características de los hongos. Se observaron las estructuras microscópicas y se clasificó por géneros.

#### 5. Variables evaluadas en la prospección de bacterias y hongos de la rizósfera del arroz.

Durante la prospección de hongos y bacterias de la rizosfera del arroz, se evaluaron diferencias significativas en cuanto al número total de aislamientos para las variables *ciclo de cultivo, fase fenológica, sección de la rizósfera y diluciones* (Tabla 8).

**Tabla 8.** Variables evaluadas en la prospección de hongos y bacterias de la rizósfera del arroz.

CICLO DE CULTIVO	FASE FENOLÓGICA	SECCIÓN DE LA RIZOSFERA	DILUCIONES
1. Primer Ciclo (Agosto-diciembre 2016)	1. Fase vegetativa	1. Suelo	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup>
2. Segundo Ciclo (mayo-septiembre 2017)	2. Fase de floración	2. Suelo+Raíz	10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup> 10 <sup>-7</sup>
	3. Fase de maduración	3. Raíz	



### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. BACTERIAS RIZOSFÉRICAS

##### 1.1. Prospección de Bacterias Rizosféricas en el Cultivo de Arroz

En la prospección de bacterias rizosféricas autóctonas se obtuvieron un total de 317 aislamientos. En el anexo 1 se detalla la cantidad de aislamientos obtenidos por cada variable evaluada (ciclo de cultivo, fase fenológica, sección de la rizósfera, dilución).

Los datos obtenidos cumplen los supuestos de normalidad, por lo que se utilizó una prueba paramétrica para el análisis de los datos obtenidos durante la prospección de bacterias autóctonas. Las variables empleadas explican en un 18% (Tabla 9) la presencia de las bacterias aisladas de la rizósfera del arroz en el sitio muestreado.

**Tabla 9.** *Resumen de ajustes (Datos de las bacterias rizosféricas).*

R cuadrado	0.251633
R cuadrado ajustado	0.179422
Raíz del error cuadrático medio	0.765712
Media de respuesta	1.344258
Observaciones (o suma de pesos)	126

El análisis de varianza para el total de bacterias aisladas de la rizósfera (317), indica que existieron diferencias significativas entre los ciclos de cultivo y las diluciones empleadas, mientras que no existieron diferencias significativas entre las distintas secciones de la rizósfera y las fases fenológicas (Tabla 10).

**Tabla 10.** *Análisis de varianza para el total de bacterias aisladas de la rizósfera del arroz.*

<b>Análisis de varianza</b>					
<i>Fuente</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>Razón F</i>	
Modelo	11	22.474405	2.04313	3.4847	
Error	114	66.839973	0.58632		Prob > F
C. Total	125	89.314379			0.0003
<b>Prueba de Factores</b>					
<i>Fuente</i>	<i>N parámetros</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Razón F</i>	<i>Prob &gt; F</i>
Ciclo de Cultivo	1	1	3.360203	5.731	0.0183
Fase Fenológica	2	2	2.558414	2.1818	0.1175
Sección de la Rizósfera	2	2	0.013711	0.0117	0.9884
Dilución	6	6	16.542078	4.7023	0.0003

Para la variable “Ciclo de Cultivo” el primer ciclo es quien aporta la mayor cantidad de bacterias aisladas de la rizósfera del arroz, mientras que para la variable “Dilución”, se observa que la dilución  $10^{-4}$  fue de la cual se aisló mayor cantidad de bacterias autóctonas. En el Tabla 11 (ANOVA) se observa que el **primer ciclo de cultivo** y la **dilución  $10^{-4}$**  aportaron la mayor cantidad de bacterias de la rizósfera del arroz.

**Tabla 11.** *Estimación de parámetros (ANOVA)-Bacterias de la rizósfera del arroz*

Estimación de los parámetros				
<i>Término</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Razón t</i>	<i>Prob &gt;  t </i>
Constante del modelo	1.3442577	0.068215	19.71	<.0001
Ciclo de Cultivo[Primer ciclo]	0.1633042	0.068215	2.39	0.0183
Fase Fenológica[floración]	0.1657436	0.096471	1.72	0.0885
Fase Fenológica[maduración]	-0.18214	0.096471	-1.89	0.0616
Sección de la Rizósfera[raíz]	-0.006463	0.096471	-0.07	0.9467
Sección de la Rizósfera[suelo]	0.0147163	0.096471	0.15	0.879
Dilución[10 <sup>-1</sup> ]	-0.683175	0.167092	-4.09	<.0001
Dilución[10 <sup>-2</sup> ]	-0.127619	0.167092	-0.76	0.4466
Dilución[10 <sup>-3</sup> ]	0.2747212	0.167092	1.64	0.1029
Dilución[10 <sup>-4</sup> ]	0.5065039	0.167092	3.03	0.003
Dilución[10 <sup>-5</sup> ]	0.2693956	0.167092	1.61	0.1097
Dilución[10 <sup>-6</sup> ]	-0.083584	0.167092	-0.5	0.6179

De acuerdo a Calvo y Zúñiga (2010) se señala que las poblaciones de bacterias en el suelo no se distribuyen al azar. Factores como la composición de los suelos, la materia orgánica, el pH, el agua y la disponibilidad de oxígeno, junto con la planta huésped, desempeñan un papel importante. La concentración de bacterias que se encuentran alrededor de las raíces de las plantas en la llamada rizósfera es mucho mayor que en el resto del suelo esto se puede deber a los niveles de nutrientes en la zona que rodea a las raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas. Podemos señalar entonces que la presencia de bacterias autóctonas aisladas de la rizósfera del arroz está influenciada por los parámetros fisicoquímicos del suelo (Anexo 2) muestreado, la parcela evaluada cuenta con un pH de 5.8, considerado como ácido, no obstante permite el desarrollo de bacterias en la rizósfera.

Estudios realizados por Calvo *et al.* (2008), indican que en suelos con pH de 5.6 la mayoría de los microorganismos beneficiosos para los cultivos existen y sus enzimas son activas. Los aislamientos bacterianos derivados en esta investigación se ajustan a los resultados obtenidos por Calvo y Zuñiga (2010), quienes observaron que el 100% de las cepas aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*), crecieron bien a pH 4 y 5.5, lo que indica una buena adaptación de las bacterias rizosféricas a suelos de pH ácido.

El porcentaje de materia orgánica (Laboratorio de Suelos IDIAP, Divisa) es bajo (1.04%), siendo posiblemente otro factor condicionante de la cantidad y diversidad bacteriana aislada, ya que la materia orgánica es fuente de carbono para las bacterias. La actividad microbiana depende de la humedad y de la temperatura del suelo, pero mucho más de la disponibilidad de carbono, fácilmente accesible que es utilizado como fuente de energía (Espinoza, 1996). Los suelos con alto contenido de materia orgánica contienen microorganismos con demandas metabólicas complejas; mientras que la fracción del suelo asociada a las raíces de las plantas posee un nivel más elevado de organismos con exigencias simples (Mora, 2006), lo que sugiere una posible explicación para la selección de la rizósfera como área para el aislamiento de estos posibles microorganismos benéficos, tanto en cantidad como en diversidad, tomando en cuenta nuestros valores de bajo contenido de materia orgánica.

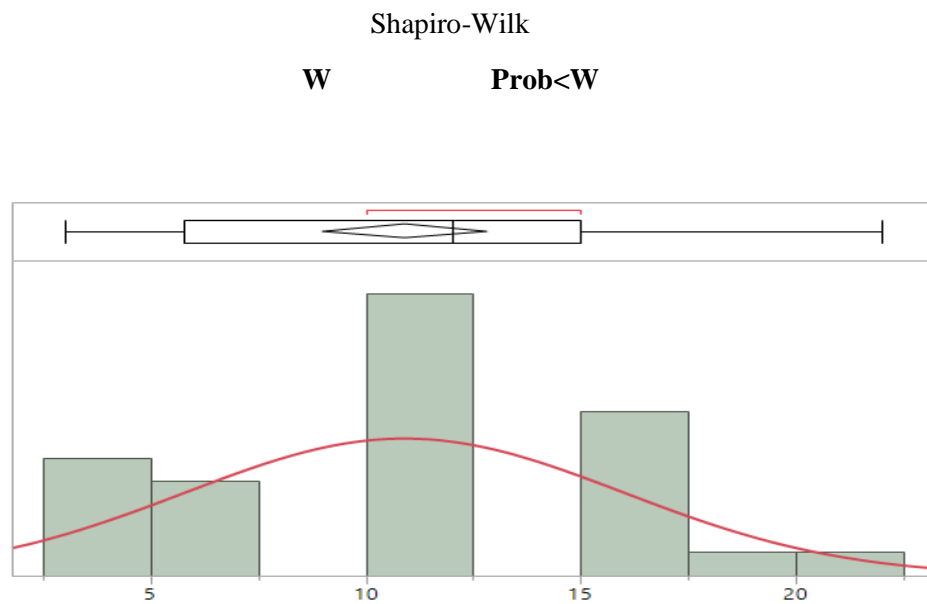
La diferencia estadística en la variable “Ciclo de cultivo” en correlación a la cantidad de aislamientos, puede estar relacionada a la humedad del suelo. Vázquez y Zúñiga (2008), señalan que un porcentaje de humedad más alto favorece la actividad de los microorganismos en el suelo. Los milímetros de lluvia durante el período de muestreo 2016 (1070.5 mm) fueron superiores a los del período 2017 (779 mm), (Anexo 3).

Los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de bacterias aisladas durante el período de mayor precipitación son comparables con lo observado por Ramos y Zúñiga (2008), quienes encontraron diferencias significativas entre tratamientos, midiendo la actividad microbiana tanto por el método de producción de CO<sub>2</sub>, como por el método de actividad deshidrogenasa; ambos métodos permitieron apreciar que un porcentaje de humedad más alto favorece la actividad de los microorganismos en el suelo.

Estadísticamente se comprobó que hay diferencia significativa en la variable dilución para lo cual se observó un mayor número de aislamientos en la dilución 10<sup>-4</sup>, debido al efecto positivo en la proliferación de bacterias; también por calidad y cantidad de nutrientes lo que conlleva a un menor estrés entre ellas. Este resultado es comparable con lo descrito por Sánchez y Ortiz (2014) quienes reportan que en la dilución 10<sup>-4</sup> fue la que permitió un número mayor de cepas bacterianas.

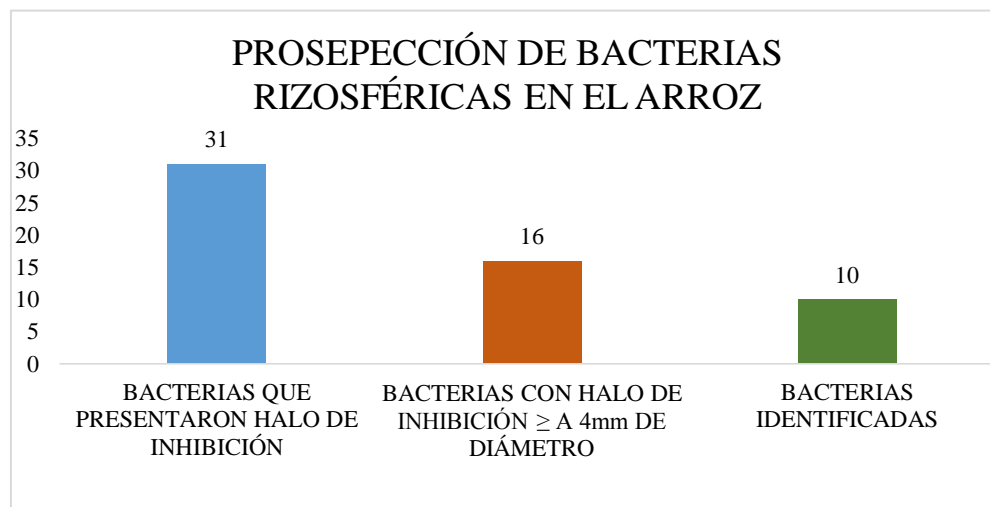
## 1.2. Determinación de la Capacidad Antagónica en Bacterias

La prueba de Shapiro-Wilk para los diámetros de los halos de inhibición de las cepas bacterianas identificadas indica que los datos tienen igual frecuencia de distribución bajo la campana de Gauss (Figura 8), por lo que se utilizó pruebas paramétricas para el análisis de los resultados.



**Figura 8.** Histograma. Normalidad de los datos de enfrentamiento Bacterias rizosféricas vs *B. glumae*

Del total de bacterias aisladas de la rizofra del arroz (317), 31 presentaron halo de inhibición y a su vez 16 mostraron un halo de inhibición  $\geq$  a 4mm y 10 fueron identificadas taxonómicamente al mostrar halos de inhibición más significativos frente *B. glumae* (Figura 9).



**Figura 9.** Bacterias con capacidad antagónica

Las 10 cepas identificadas reunían las características de antagonistas al presentar un diámetro de halo de inhibición mayor o igual a 4 mm, las cuales fueron identificadas taxonómicamente dentro del género *Bacillus*, de alta presencia en la rizósfera de diversos cultivos debido a su capacidad de formación de esporas que le da ventaja de supervivencia en la rizósfera vegetal según Calvo y Zúñiga (2010). A pesar de que el suelo muestreado presentó un pH ácido, no es un limitante para la presencia de este microorganismo. Como indican estudios previos llevados a cabo con valores de pH bajos en suelo (Nishijima et al. 2005) demostrando la presencia activa de especies de *Bacillus*.

Por su parte, Tejera, Rojas, y Heydrich (2011), reportaron que el género *Bacillus* comprende una amplia variedad de especies que se encuentran en muchas ocasiones asociadas a las plantas, ejerciendo un efecto positivo sobre el crecimiento a través de una serie de mecanismos que involucran la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos. Los miembros de este género, se han aislado de numerosos cultivos de interés económico como la caña de azúcar, el algodón, el trigo, el maíz, la papa y el arroz.

El mayor poder inhibitorio frente a *B. glumae*, lo presentaron seis cepas identificadas como *Bacillus spp.*, dos cepas identificadas como *Bacillus cereus*, una cepa identificada como *Bacillus subtilis* y una cepa identificada como *Lactobacillus plantarum* (Tabla 12).

**Tabla 12.** Cepas bacterianas con el mayor porcentaje de inhibición frente a *B. glumae*.

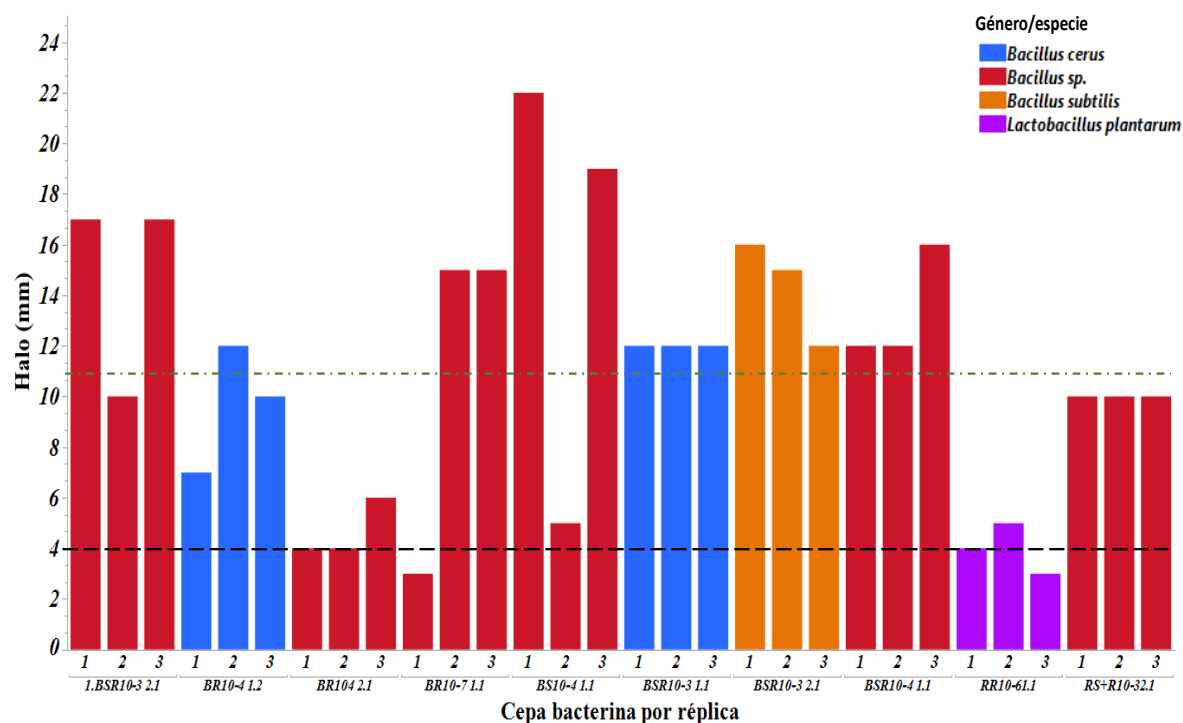
Género	Código De Cepas	Cantidad De Cepas
<i>Bacillus spp.</i>	1.BSR10-3 2.1 ; BR10-4 2.1; BR10-7 1.1; BS10-4 1.1 ; BSR10-4 1.1; RS+R10-32.1	6
<i>Bacillus cereus</i>	BR10-4 1.2 ; BSR10-3 1.1	2
<i>Bacillus subtilis</i>	BSR10-3 2.1	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	RR10-61.1	1

Badía *et al.* (2011), indican que las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces.



Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizósfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Los miembros de este género tienen un gran potencial para su uso en la agricultura. Muchas cepas tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos.

En la Figura 10 se observa el tamaño de los halos de inhibición en cada una de las réplicas (3) de las cepas identificadas. La media en el tamaño de los halos de inhibición corresponde a 10.9 mm de diámetro.



**Figura 10.** Tamaño de los halos de inhibición de las cepas identificadas (por replica). La línea verde paralela al eje x separa las réplicas cuyo halo de inhibición es  $\geq 4$  mm de diámetro; la línea color negro paralela al eje x indica la media de los halos de inhibición.

El análisis de varianza (Tabla 13) permite observar diferencias en el promedio del diámetro del halo de inhibición de cada cepa identificada. Los factores o variables involucradas en el modelo utilizado para las pruebas de enfrentamiento *in vitro* explican o aportan en un 36% a la formación del halo de inhibición (Tabla 13). El ANOVA indica que hubo diferencia en el tamaño promedio del halo de inhibición de las cepas identificadas. Es decir que por lo menos una cepa tiene mayor poder de inhibición ante el patógeno, prevaleciendo la cepa BS10<sup>-4</sup> 1.1 (*Bacillus spp.*) con una media en el tamaño del halo de inhibición de 15.33 mm de diámetro.

**Tabla 13.** *Análisis de varianza para el halo de inhibición formado por las bacterias identificadas*

ANOVA					
R cuadrado			0.56274		
R cuadrado ajustado			0.365973		
Raíz del error cuadrático medio			4.062019		
Media de respuesta			10.9		
Observaciones (o suma de pesos)			30		

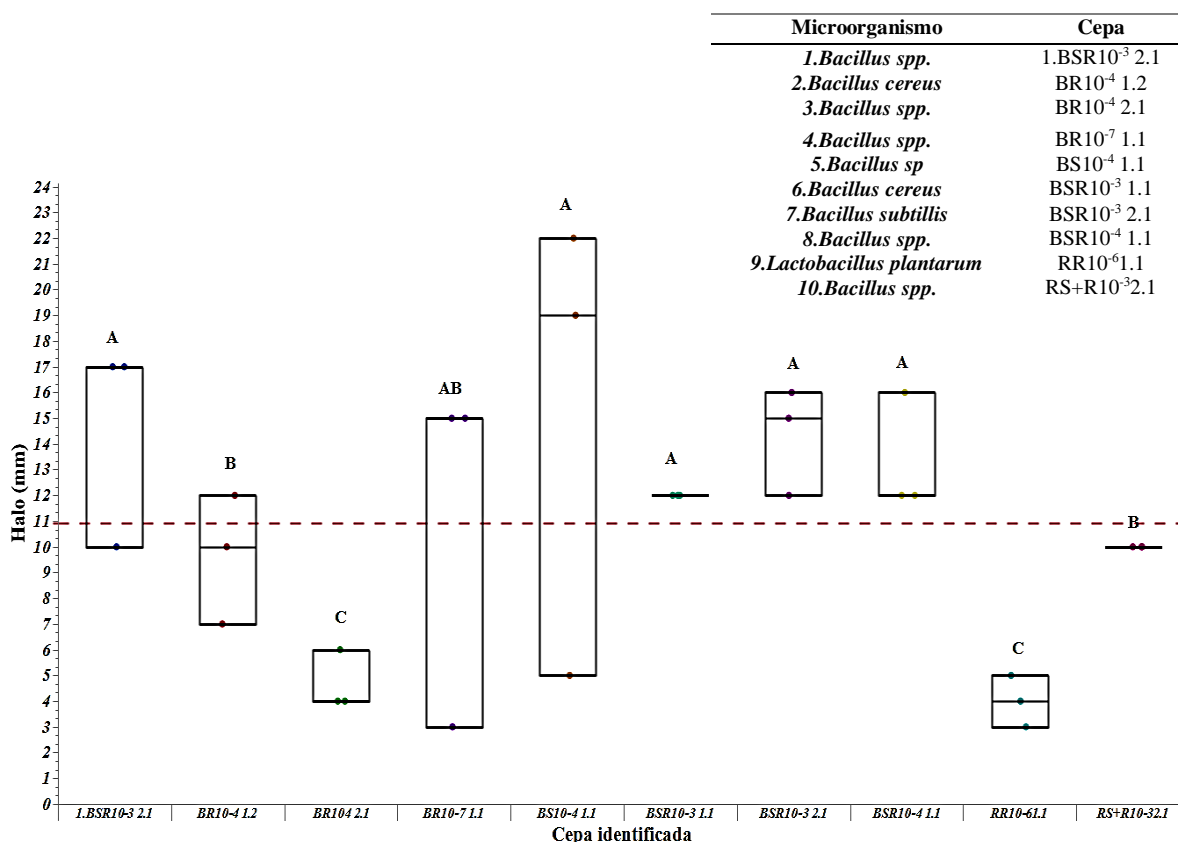
  

<i>Fuente</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>Razón F</i>	<i>Prob &gt; F</i>
Cepa	9	424.7	47.1889	2.8599	0.0241
Error	20	330	16.5		
C. Total	29	754.7			

	<i>Nivel</i>	<i>Número</i>	<i>Media</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Extremo inferior del IC al 95%</i>	<i>Extremo superior del IC al 95%</i>
<i>Bacillus spp.</i>	1.BSR10 <sup>-3</sup> 2.1	3	14.6667	2.3452	9.77	19.559
<i>Bacillus cereus</i>	BR10 <sup>-4</sup> 1.2	3	9.6667	2.3452	4.77	14.559
<i>Bacillus spp.</i>	BR10 <sup>-4</sup> 2.1	3	4.6667	2.3452	-0.23	9.559
<i>Bacillus spp.</i>	BR10 <sup>-7</sup> 1.1	3	11	2.3452	6.11	15.892
<i>Bacillus spp.</i>	BS10 <sup>-4</sup> 1.1	3	15.3333	2.3452	10.44	20.225
<i>Bacillus cereus</i>	BSR10 <sup>-3</sup> 1.1	3	12	2.3452	7.11	16.892
<i>Bacillus subtilis</i>	BSR10 <sup>-3</sup> 2.1	3	14.3333	2.3452	9.44	19.225
<i>Bacillus spp.</i>	BSR10 <sup>-4</sup> 1.1	3	13.3333	2.3452	8.44	18.225
<i>Lactobacillus plantarum</i>	RR10 <sup>-6</sup> 1.1	3	4	2.3452	-0.89	8.892
<i>Bacillus spp.</i>	RS+R10 <sup>-3</sup> 2.1	3	10	2.3452	5.11	14.892

En el gráfico de cajas de barra (Figura 11) muestra una línea que representa la media de los halos de inhibición (10.9 mm de diámetro), los valores por arriba de esta, corresponden a las réplicas con mayor capacidad antagónica. La tendencia de los datos indica que las cepas identificadas con la letra A corresponden a los mejores cepas, seguida por la AB, B y por último la C. El mayor tamaño en el halo de inhibición corresponde a una réplica de la cepa BSR10<sup>-4</sup> 1.1 (*Bacillus spp.*), cepa que presenta mayor poder de inhibición del patógeno al contar con el mayor halo de inhibición promedio (15.33 mm).



**Figura 11.** Gráfico de Cajas. Diámetros del halo de inhibición de las cepas bacterianas identificadas. Valores con una letra común no son significativamente diferentes.

Renche y Fiuza (2005), al analizar la diversidad de bacterias en aguas de irrigación de los campos sembrados con arroz en diferentes etapas del cultivo obtuvieron que el género *Bacillus* representaba el 39% de los 315 aislados, lo que denota la predominancia de éste en la población bacteriana total. Los miembros de este género tienen un gran potencial para su uso en la agricultura. Muchas cepas tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos, fijan nitrógeno, presentan una alta velocidad de crecimiento, forman endosporas resistentes a la desecación, el calor y las radiaciones ultravioletas y sobreviven en diversas condiciones (Liu *et al.* 2006).

El estudio de esta capacidad de *Bacillus* se inició por el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; en la actualidad diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Villarreal *et al.* (2017), señalan en su publicación “*El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola*” que las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluyen A) la excreción de antibióticos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) toxinas y E) induciendo la resistencia sistémica de la planta (IRS).

Los géneros bacterianos identificados mediante API son similares a los reportados por Badía *et al.* (2011), en su trabajo sobre *Aislamiento y caracterización de cepas de **Bacillus** asociadas al cultivo del arroz (**Oryza sativa** L) señalando que los resultados obtenidos mediante la secuenciación del ADNr de las cepas aisladas para la determinación del nivel de especie, se identificaron como **Bacillus subtilis**, **B. cereus** y **Bacillus spp.***

Las bacterias identificadas como antagonistas de **B. glumae**, han sido reportadas como controladores biológicos de diversos fitopatógenos, Peláez y Vivas (2017), indican que la especie **Bacillus subtilis** se caracteriza por poseer propiedades que ayudan al crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas, además de que actúan como control biológico de algunas enfermedades, entre ellas, al control de **B. glumae**.

Entre el grupo de bacterias utilizadas como agentes de control biológico, quizás una de las especies más estudiadas sea **Bacillus subtilis**. Existen bioproductos comercializables que contienen esta especie como componente biológico activo y se utilizan en campo para el control de enfermedades causadas fundamentalmente por hongos del suelo que atacan la raíz de las plantas (McSpadden, 2002).

Cabra *et al.*, (2014) indica que la quitinasa purificada de **Bacillus cereus** inhibe el crecimiento de los hongos fitopatógenos **Fusarium oxysporum** y **Pythium ultimum**, según lo demostraron Chang, Chen, y Wang en su investigación. Por su parte Alvarado y Rivero (2009), observaron la capacidad antagonica de cinco cepas de **Lactobacillus plantarum**, aisladas de un pastizal de finca lechera, ante **Salmonella typhi** y **Listeria monocytogene** de las cuales, cuatro fueron por la producción de ácidos orgánicos.

Mencionan a su vez el antagonismo de *Lactobacillus plantarum* en bioconservación de los alimentos y en la terapia probiótica. Esta especie ha sido objeto de interés durante las últimas décadas por producir una amplia gama de compuestos activos contra bacterias patógenas y hongos que pueden ser utilizados como bioconservantes muy efectivos en la industria alimentaria y adicionalmente estas cepas pudieran ejercer antibiosis contra bacterias indeseables en el tracto intestinal del consumidor de estos alimentos.

Sin embargo, a pesar que *Lactobacillus Plantarum* como *Bacillus Cereus* ha sido aislado de suelos, sus posibles aplicaciones como agente de control biológico de microorganismos fitopatógenos no se han estudiado con intensidad.

### 1.3. Cinética de Crecimiento Bacteriano

Para abordar el aspecto cuantitativo de la interacción antagónica *bacteria rizosféricas-B.glumae*, se tomaron al azar 2 de las 10 cepas identificadas y se realizó una prueba de cinética de crecimiento. Las cepas rizosféricas sometidas a esta prueba corresponden al género *Bacillus spp.* (Cepa RS+R10-32.1) y *Lactobacillus plantarun* (Cepa RR10-61.1) (Tabla 14). En las Tablas 15 y 16 se muestran las lecturas de absorbancia mientras que en las Figuras 12 y 13 se aprecian las curvas de crecimiento de las bacterias rizosféricas y de la *B. glumae*.

**Tabla 14.** Cepas seleccionadas para la cinética de crecimiento bacteriano

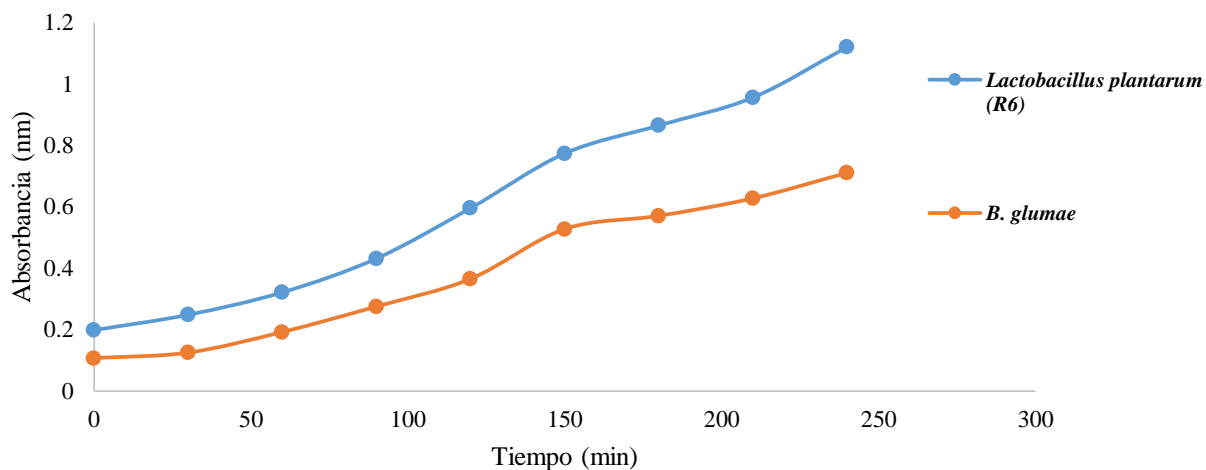
Ciclo de Cultivo	Fase Fenológica	Sección de la Rizósfera	Dilución	Microorganismo	Código de la cepa
Primer ciclo	floración	Suelo+raíz	10 <sup>-3</sup>	<i>Bacillus spp.</i>	RS+R10 <sup>-3</sup> 2.1 (R14)
Primer ciclo	floración	Raíz	10 <sup>-6</sup>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	RR10 <sup>-6</sup> 1.1 (R6)

La cinética de crecimiento permite conocer la velocidad de multiplicación de las células bacterianas aisladas de la rizósfera del arroz en contraste a la cepa de *B. glumae*. Observamos que las células de ambas cepas rizosféricas se multiplicaron mas rápido que las de el patógeno *B. glumae*, durante el periodo evaluado

**Tabla 15.** Datos de la absorbancia Cepa R6 vs *B.glumae*

TIEMPO (min)	Absorbancia <i>Lactobacillus plantarum</i> (R6)	Absorbancia <i>B. glumae</i>
0	0.108	0.108
30	0.249	0.126
60	0.322	0.193
90	0.432	0.276
120	0.596	0.366
150	0.774	0.528
180	0.865	0.571
210	0.956	0.628
240	1.120	0.711

### Cinética de Crecimiento Microbiano (*Lactobacillus plantarum* vs *B.glumae*)



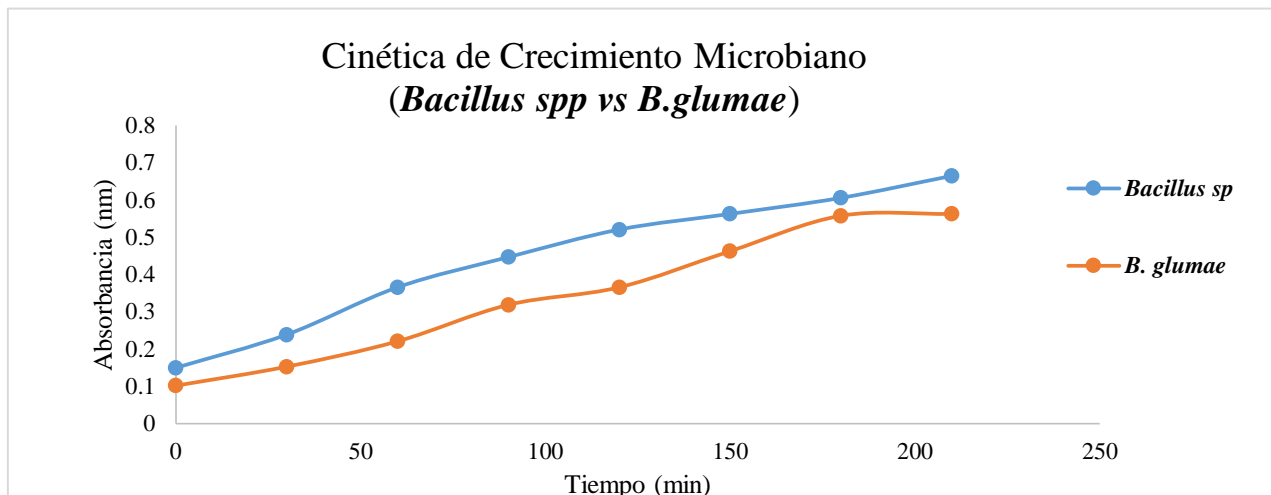
**Figura 12.** Cinética de crecimiento *B.glumae* vs *Lactobacillus plantarum*

Fue notoria la diferencia en la velocidad de multiplicación celular de la cepa de *Lactobacillus plantarum* en función de la *B.glumae* a partir de las 2 h (120 min), a las 4 h (240 min) de ensayo continuaba la tendencia a aumentar su crecimiento.

**Tabla 16.** Datos de la absorbancia Cepa R14 vs *B.glumae*

<i>TIEMPO (min)</i>	<i>Absorbancia Bacillus spp (R14)</i>	<i>Absorbancia B. glumae</i>
0	0.15	0.102
30	0.239	0.153
60	0.366	0.221
90	0.447	0.319
120	0.521	0.366
150	0.563	0.463
180	0.606	0.558
210	0.665	0.563





**Figura 13.** Cinética de crecimiento *B. glumae* vs *Bacillus spp*.

Por su parte, para la cepa de *Bacillus spp* se observó un mayor crecimiento en función de *B. glumae* a partir de 0.5 h (30 min) hasta 2.5 h (150 min), en donde *B. glumae* aumentó su crecimiento acercándose a una velocidad de multiplicación celular similar a la cepa rizosférica, sin embargo, a partir de las 3 h *B. glumae* entra en fase estacionaria y pocos minutos más tarde inicia su fase de declinación o muerte, mientras que *B. subtilis* continua en fase exponencial.

Esto pudiera sugerir, que la inhibición producida por las cepas evaluadas estaría relacionada con la competencia por los nutrientes entre el patógeno y la cepa, ya que al mostrar una tasa metabólica más alta, este asimila más rápidamente los nutrientes, logrando un tiempo de duplicación más rápido que el patógeno, generándose los correspondientes metabolitos secundarios que pudieran explicar el efecto inhibitorio en el crecimiento del patógeno (halo de inhibición).

## 2. HONGOS RIZOSFERICOS

### 2.1. Prospección de Hongos Rizosféricos en el Cultivo de Arroz

Durante la prospección de hongos rizosféricos se obtuvo un total de 112 aislamientos. En el anexo 5 se detallan la cantidad de cepas fúngicas obtenidas en cada una de las variables evaluada (ciclo de cultivo, fase fenológica, sección de la rizósfera y diluciones). Los datos obtenidos cumplen los supuestos de normalidad, las variables empleadas explican en un 24% la presencia de hongos en la rizósfera del arroz (Tabla 17).

**Tabla 17.** *Resumen de Ajuste-Datos de la prospección de hongos rizosféricos*

Resumen del ajuste	
R cuadrado	0.310006
R cuadrado ajustado	0.243427
Raíz del error cuadrático medio	0.65621
Media de respuesta	0.569426
Observaciones (o suma de pesos)	126

Se realizó un análisis de varianza para el total de hongos aislados de la rizósfera (112), observando que existieron diferencias significativas entre los ciclos de cultivo y las diluciones empleadas, mientras que no existieron diferencias significativas entre las distintas secciones de la rizósfera y las fases fenológicas (Tabla 18).

**Tabla 18.** Análisis de varianza para el total de hongos aislados de la rizósfera del arroz.

<b>Análisis de varianza</b>					
<i>Fuente</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>Razón F</i>	
<b>Modelo</b>	11	22.055378	2.00503	4.6563	
<b>Error</b>	114	49.089666	0.43061		Prob > F
<b>C. Total</b>	125	71.145044			<.0001
<b>Prueba de efectos</b>					
<i>Fuente</i>	<i>N parámetros</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Razón F</i>	<i>Prob &gt; F</i>
<b>Ciclo de Cultivo</b>	1	1	2.975785	6.9106	0.0097
<b>Fase fenológica</b>	2	2	0.387545	0.45	0.6388
<b>Sección de la rizósfera</b>	2	2	0.898724	1.0435	0.3555
<b>Dilución</b>	6	6	17.793325	6.8869	<.0001
<b>Dilución</b>					
Nivel				Media	
10-2	A			1.7777778	
10-1	A			1.5	
10-3	A			1.5	
10-4	A	B		0.6666667	
10-5		B		0.2777778	
10-6		B		0.2777778	

En el Tabla 19 se observa que el la **dilución 10<sup>-2</sup>** aportan la mayor cantidad de hongos aislados de la rizósfera del arroz, mientras que en el segundo ciclo se aisló la mayor cantidad de hongos rizosféricos.

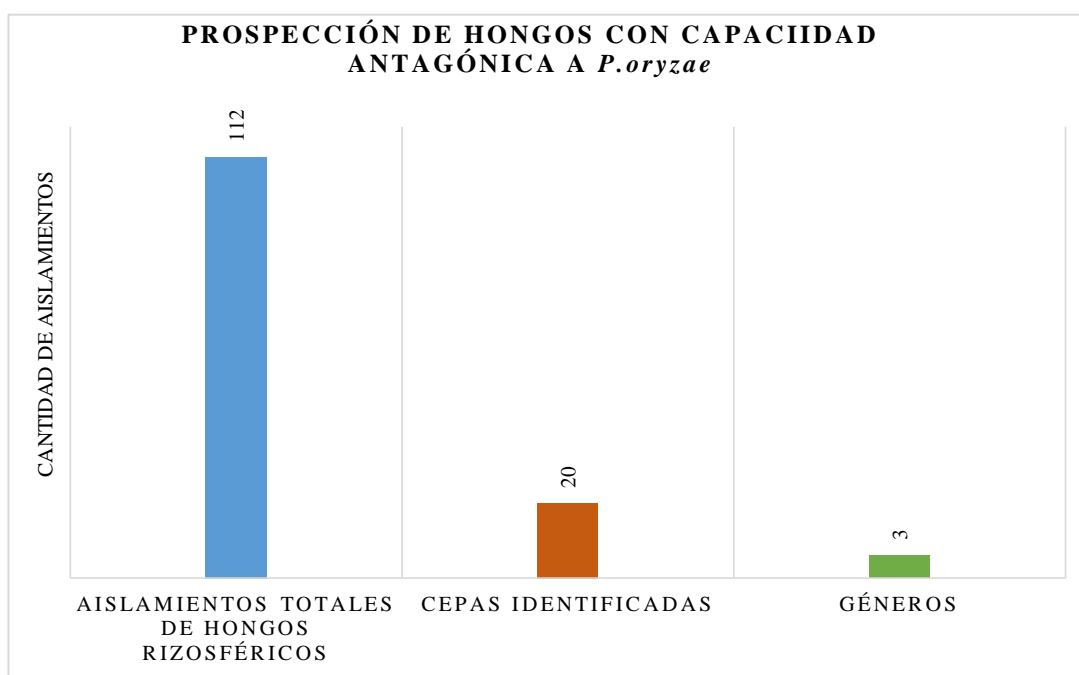
**Tabla 19.** *Estimación de parámetros-Prospección de hongos rizosféricos.*

<i>Término</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Razón t</i>	<i>Prob &gt;  t </i>
Constante del modelo	0.5694257	0.05846	9.74	<.0001
Ciclo de Cultivo[Primer ciclo]	-0.153679	0.05846	-2.63	0.0097
Fase fenológica[floración]	0.0338668	0.082675	0.41	0.6828
Fase fenológica[maduración]	0.0443316	0.082675	0.54	0.5929
Sección de la rizósfera[raíz]	-0.119438	0.082675	-1.44	0.1513
Sección de la rizósfera[suelo]	0.059971	0.082675	0.73	0.4697
Dilución[10 <sup>-1</sup> ]	0.3966245	0.143197	2.77	0.0066
Dilución[10 <sup>-2</sup> ]	0.4982038	0.143197	3.48	0.0007
Dilución[10 <sup>-3</sup> ]	0.3722066	0.143197	2.6	0.0106
Dilución[10 <sup>-4</sup> ]	-0.141273	0.143197	-0.99	0.3259
Dilución[10 <sup>-5</sup> ]	-0.356735	0.143197	-2.49	0.0142
Dilución[10 <sup>-6</sup> ]	-0.356735	0.143197	-2.49	0.0142

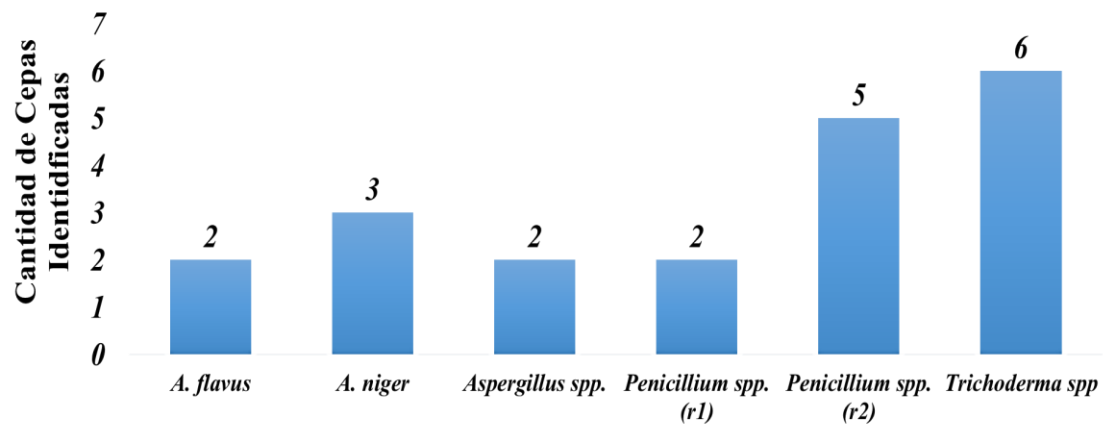
Podemos señalar que posiblemente la materia orgánica desempeñó un papel relevante en la cantidad y diversidad de géneros fúngicos aislados de la rizósfera, debido a que los hongos utilizan la materia orgánica en descomposición como fuente de energía, un % MO bajo puede influir directamente en el desarrollo de los mismo. Escobar, (2014) en su publicación *Extracción e identificación de microorganismos asociados al cultivo del ají (Capsicum annuum) en La Mesa (Cundinamarca)* señaló como resultado que en suelos en donde la carencia de materia orgánica es alta, la extracción de microorganismos por medio de las trampas de arroz es muy baja.

## 2.2. Determinación de la Capacidad Antagónica en Hongos

De los 112 aislamientos, 20 cepas se lograron identificar como antagonistas significativos de *Pyricularia oryzae*, agrupados en 3 géneros (Figura 14).



Del género *Aspergillus*, 2 cepas corresponden a *Aspergillus flavus*, 3 a *Aspergillus niger*, 2 a *Aspergillus spp.*; del género *Penicillium*, 2 cepas corresponden a *Pennicillium sp* (morfofoto r1), 5 a *Penicillium spp.* (morfofoto r2) y 6 cepas corresponden al género *Trichoderma spp.* (Figura 15). Las características macro y microscópicas de los géneros con actividad antagónica frente a *Pyricularia oryzae* se describen en el anexo 6.



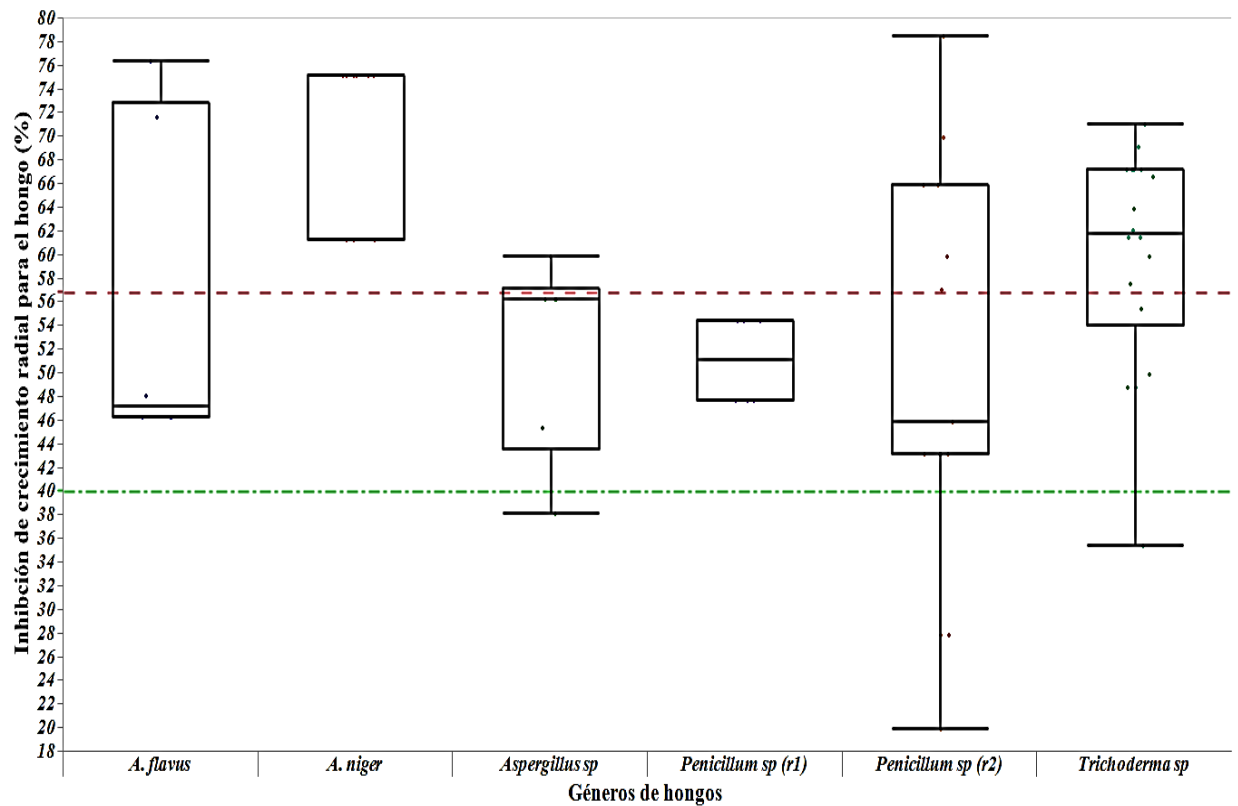
**Figura 15.** Géneros fúngicos con capacidad antagónica.

El R cuadrado ajustado (Tabla 20) nos indica que las variables involucradas en el modelo para las pruebas de antagonismo *in vitro*, explican en un 23% la inhibición del patógeno, por parte de los géneros fúngicos aislados en la rizósfera del arroz.

**Tabla 20.** ANOVA de 1 Factor

R cuadrado	0.301051
R cuadrado ajustado	0.236333
Raíz del error cuadrático medio	11.56835
Media de respuesta	56.87277
Observaciones (o suma de pesos)	60

En el gráfico caja barra (Figura 16) se observa que una de las cepas del género *Trichoderma spp*, posee la mediana por arriba del valor promedio (56.87) por lo que correspondería a la cepa con mejor poder inhibitorio.



**Figura 16.** Gráfico caja barras de las cepas identificadas. La línea roja representa el promedio del PCIR para las cepas con capacidad antagónica a *P. oryzae*. La línea verde corresponde al criterio utilizado para seleccionar los hongos como antagonistas positivos (PCIR  $\geq$  40 %).

Para comprobar lo mencionado, se efectuó un análisis de varianza (Tabla 21) para los valores de % de inhibición (a los 8 días) entre las cepas identificadas con capacidad antagónica frente a *P. oryzae*, observando que el porcentaje de inhibición promedio más elevado entre las cepas pertenece al género *Aspergillus niger*, siendo este, el género fúngico que en promedio actúa como mejor antagonista del patógeno *Pyricularia oryzae*.

**Tabla 21.** ANOVA-Cepas fúngicas identificadas con capacidad antagónica

<i>Fuente</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>Razón F</i>	<i>Prob &gt; F</i>
Género 1	5	3112.649	622.53	4.6518	0.0013
Error	54	7226.642	133.827		
C. Total	59	10339.291			
<i>Nivel</i>	<i>Número</i>	<i>Media</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Extremo inferior del IC al 95%</i>	<i>Extremo superior del IC al 95%</i>
<i>A. flavus</i>	6	55.9594	4.7228	46.491	65.428
<i>A. niger</i>	9	70.6723	3.8561	62.941	78.403
<i>Aspergillus spp.</i>	6	52.1212	4.7228	42.653	61.59
<i>Penicillium spp.</i> (R1)	6	51.1818	4.7228	41.713	60.65
<i>Penicillium spp.</i> (R2)	15	49.2386	2.9869	43.25	55.227
<i>Trichoderma spp.</i>	18	60.1201	2.7267	54.653	65.587

Se realizó la prueba de Tukey-Kramer (Tabla 22) para comparar el promedio de inhibición de los géneros identificados a los 8 días de enfrentamiento, resultando *A. niger*, *Trichoderma spp* y *A. flavus* con poder inhibitorio similares, diferenciándose del resto de las cepas.



**Tabla 22.** Prueba de Tukey Kramer para las cepas fúngicas identificadas

Nivel			Media
<i>A. niger</i>	A		70.672269
<i>Trichoderma spp.</i>	A	B	60.120133
<i>A. flavus</i>	A	B	55.959384
<i>Aspergillus spp.</i>		B	52.121212
<i>Penicillium spp. (R1)</i>		B	51.181818
<i>Penicillium spp. (R2)</i>		B	49.23861

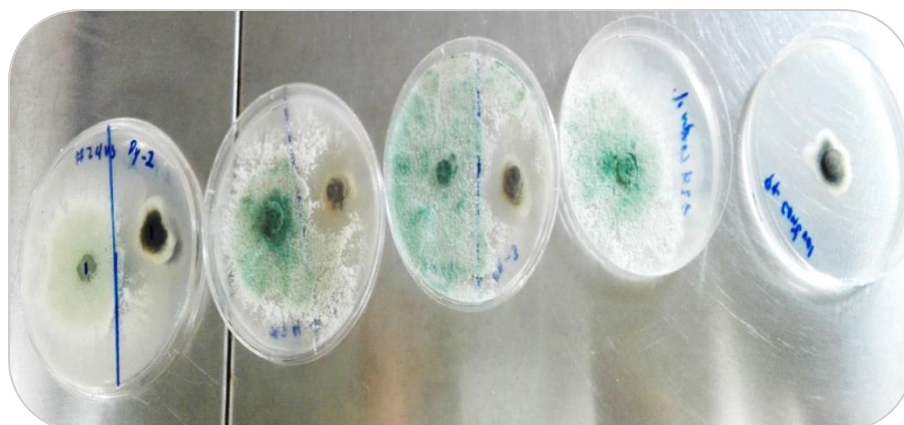
Los géneros identificados con potencial antagónico frente a *P. oryzae*, son similares a los géneros fúngicos aislados del suelo reportados en varias publicaciones. Arias y Piñeros, (2008), observaron que en los suelos evaluados, los aislamientos más comunes de hongos, pertenecían al género *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.* Por su parte, Quisbert, Loza, Flores, Nina, y Canaviri, (2017), aislaron 44 especies de hongos filamentosos de suelo, el género *Penicillium* fueron los más abundantes (8), seguido de *Alternaria* (3) *Rhizopus* y *Mucor* (1), *Fusarium* (1) y *Trichoderma* (1),

Para los géneros identificados que inhiben el crecimiento de *P. oryzae*, podemos mencionar que el género *Trichoderma spp.* es uno de los más estudiados como controlador biológico de fitopatógenos de importancia agrícola. Para autores como Martínez, González, y Reyes (2009), las especies del género *Trichoderma spp.* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos.

### ***Trichoderma spp.***

Pérez y Saavedra (2011), indicaron que evaluando la aplicación de materia orgánica y *Trichoderma* en 7 variedades de arroz, sembrados fuera de la época de siembra (febrero), para evaluar la incidencia de *B. glumae*, se obtuvieron los mejores rendimientos promedios, cuando se hizo aplicación de *Trichoderma* al suelo. Igualmente se encontró que la incidencia de la bacteria fue menor en el tratamiento de *Trichoderma* + materia orgánica esto debido a que el hongo *Trichoderma* ejerce un efecto antagónico sobre patógenos del suelo como *Rhizoctonia* y *Sarocladium*, favoreciendo la sanidad y vigor de la planta de arroz.

En promedio la cepas del género *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de *P. oryzae* (Figura 17) en un 60% a los 8 días de observación (Anexo 7). Pérez *et al.* (2017), hicieron referencias respecto al antagonismo de *T. harzianum* sobre *P. grisea* manifestando que a las 96 h la cepa alcanzó un PICR del hongo fitopatógeno de 93.1 % y a partir de las 120 h se alcanzó un 100 % de capacidad antagónica.



**Figura 17.** Prueba de antagonismo in vitro *Trichoderma spp.* vs *P. oryzae*. Observación a los 5 días. De izquierda a derecha: Réplica 1, Réplica 2, Réplica 3; Control 1; Control 2.

Podemos inferir que los mecanismos de acción de las cepas de *Trichoderma spp.*, aisladas de la rizósfera del arroz es por competencia y micoparasitismo, ya que se observó la reducción de espacio por parte de *Trichoderma spp.*, posiblemente al aprovechar los nutrientes del medio de cultivo más eficientemente por contar con una velocidad de crecimiento mayor. Infante *et al.* (2009), sostiene que *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico.

De igual forma se observó la colonización de *P. oryzae* por esporas de *Trichoderma spp.* (Figura 18), quien posiblemente utiliza las enzimas extracelulares generadas por el fitopatógeno. Infante *et al.* (2009) indica que *Trichoderma spp* durante el proceso de micoparasitismo crece quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

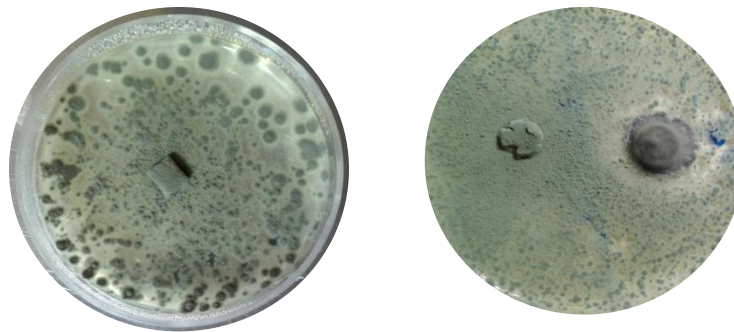


**Figura 18.** Micoparasitismo de *Trichoderma spp* sobre *P. oryzae*.

### ***Penicillium spp.***

Se obtuvieron dos cepas fúngicas del género *Penicillium* (Figura 19 y 20), identificadas como *Penicillium spp.* (*morfotipo r1*) con un PCIR a los 8 días de 47% y formaba micelio polvoriento y *Penicillium spp.* (*morfotipo r2*) formando micelio con apariencia algodonosa y con un PCIR de los 8 días de 51%. Ambas cepas de *Penicillium spp.* en los enfrentamientos duales frente a *P. oryzae* (Figura 19 y 20) mostraron un crecimiento/ desarrollo superior al fitopatógeno por lo que posiblemente el mecanismo de acción sea por competencia de nutrientes.

Caselles (2003), menciona que la mayoría de las especies del género *Penicillium spp*, destacan, principalmente, porque son hongos de almacén. Son los causantes de las “podredumbres azules o verdes” en cítricos, frutos de hueso y de pepita, uvas, melones, higos, cebollas, y hortalizas en general. No obstante se pueden destacar trabajos realizados por el INIA de Madrid, sobre una cepa de *P. oxalicum* que actúa como antagonista de distintas cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* que causan la fusariosis vascular del tomate.



**Figura 19.** Izquierda: Cepa de *Penicillium spp.* (morfotipo r1) apariencia polvorienta. Derecha: Enfrentamiento dual frente a *P. oryzae* a los 8 días de observación.



**Figura 20.** Izquierda: Cepa de *Penicillium spp.* (morfotipo r2). Apariencia Algodonosa. Derecha: Enfrentamiento dual frente *P. oryzae* a los 3 días de observación.

Caselles (2003), hace referencia a publicaciones respecto al efecto bicontrolador de *Penicillium*, en ellas se demuestra que *P. oxalicum* es capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* en estudios “*in vitro*” de crecimiento dual, al producir enzimas líticos (Alfonso y col., 1992) que degradan la pared celular del patógeno.

Castellano (2002), señala que mundialmente el género *Penicillium spp*, se ha utilizado muy poco como control biológico, a pesar, de que se ha comprobado que *Penicillium notatum* era antagonista efectivo de *Sclerotium rolfsii* tanto en suelo natural como en condiciones de campo.

#### *Aspergillus spp.*

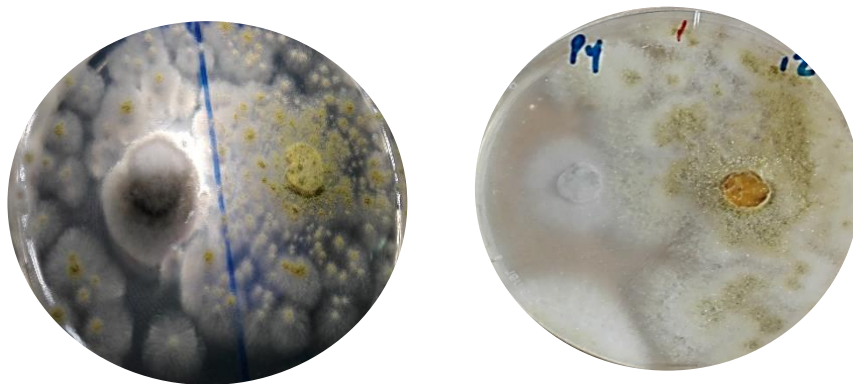
Del género *Aspergillus*, el promedio de PCIR para las cepas *Aspergillus spp.* (Figura 21) fue de 52% a los 8 días de observación, mientras que para *Aspergillus flavus* (Figura 21) el PCIR fue de 56% y para *Aspergillus niger* (Figura 21) de 71%.



**Figura 21.** Cepa de *Aspergillus spp.* Cepa de *Aspergillus flavus*. Cepa de *Aspergillus niger*

Ethur *et al.* (2004) aislaron posibles antagonistas fúngicos de cuatro diferente lugares de Rio Grande do Sul en Brasil, identificando cuatro géneros: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. A su vez sostiene que el género *Aspergillus* tiene alta capacidad de colonización y competitividad con otras especies a nivel de suelo producto de su amplia dispersión tanto en la zona de las rizósfera como en el rizoplano de las plantas.

Para el caso de *Aspergillus spp.* (Figura 22) y *Aspergillus flavus* (Figura 22) no se observó micelio de estos colonizando a *P. oryzae*, pero se evidencio la invasión de espacio del patógeno por parte de los biocontroladores, por los que podemos deducir que el mecanismo de acción de estos hongos rizosféricos fue por competencia de nutrientes o bien por antibiosis.



**Figura 22.** Izquierda: Enfrentamiento dual de cepa *Aspergillus flavus* vs *P. oryzae*. Derecha: Enfrentamiento dual de cepa *Aspergillus spp.* vs *P. oryzae*.

Castellano (2002), hace referencia a estudios realizados por Ulacio y col. (1997), en Venezuela, quienes obtuvieron en la zona de la rizósfera y rizoplaneo de plantas de tabaco *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus ustus*. Estos mismos autores en su estudio, no descartan la posibilidad de que tanto *Aspergillus terreus* como *Aspergillus flavus* tengan posibilidades antagónicas sobre algunas especies del complejo *Fusarium* y *Rhizoctonia sp.*



#### IV. CONCLUSIONES

- Se aislaron hongos y bacterias con capacidad antagónica ante los patógenos evaluados, en la rizósfera.
- La disponibilidad de microorganismos en la rizósfera puede estar influenciada por factores abióticos, como humedad del suelo, el pH, la materia orgánica, nutrientes de suelo, tipo de cultivo, como por el manejo que se le da a la parcela.
- Las cepas bacterianas con actividad antagónica pertenecen todas al género *Bacillus* (*Bacillus spp*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) y al género *Lactobacillus* (*Lactobacillus Plantarum*). El género *Bacillus* es el más estudiado y utilizado como biocontrolador o en formulaciones de bioplaguicidas ya que se le atribuye la característica de producir antibióticos y enzimas.
- En total 20 cepas fúngicas presentaron un porcentaje de inhibición significativo ( $\geq 40\%$ ) ante el fitopatógeno *P. oryzae*. Agrupadas en tres géneros: *Trichoderma spp*, *Penicillium spp*. (morfortipo r1) y *Penicillium spp*. (morfortipo r2), *Aspergillus spp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.
- El suelo agrícola tomado como referencia en la prospección de microorganismos nativos, alberga cepas microbianas antagónicas de efectividad contra los patógenos evaluados. Dentro de los que consideramos a *Trichoderma spp*. y *Bacillus subtilis* como los más prometedores en el control biológico de *P. oryzae* y *B. glumae* respectivamente, por su alta adaptabilidad y agresividad sin comprometer la salud de la planta y de hombre.

## V. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo estudios de validación de las cepas bacterianas y fúngicas con actividad antagonica a ensayos a nivel de invernadero y campo.
- Profundizar en estudios sobre el mecanismos de acción de las cepas consideradas como antagonistas efectivos en los ensayos *in vitro*.
- Evaluar la patogenicidad de las cepas antagonistas en el cultivo de arroz y su posible afectación a la salud animal y humana. Considerando de mayor relevancia las cepas de *Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Bacillus cereus* ya que ha sido repostadas en estudios como patógenos de cultivos de importancia agrícola o bien por causar toxicidad en humanos y animales.
- Realizar enfrentamientos cruzados entre las cepas identificadas con actividad antagónica y los fitopatógenos *B. glumae* y *P. oryzae*
- Efectuar estudios de adaptabilidad de los antagonistas promisorios ante diferentes condiciones de humedad, aireación, pH, temperatura y materia orgánica.
- Continuar con la prospección de microorganismos rizosféricos en diferentes zonas del país a fin de contar con un cepario de bacterias y hongos rizosféricos antagonistas adaptados a las condiciones climáticas de Panamá.

## VI. REFERENCIAS

1. Aproscello, (2013). Ficha de Información Sobre la Especie *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr. Recuperado el 2018, de APROSCELLO: [http://aproscello.com/pdf/aproscello\\_ficha\\_pdf\\_40.pdf](http://aproscello.com/pdf/aproscello_ficha_pdf_40.pdf)
2. Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), (2015). Carta Tecnológica del Cultivo de Arroz a Chuzo con Tenología para Variedades de Ciclo Corto de 100-110 Días. Panamá: Dirección Nacional de Agricultura-MIDA.
3. Acebo, *et.al.* (2011). Perspectivas del Uso de Bacterias Rizosféricas en el Control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) en el Cultivo del Arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Colombiana de Biotecnología, 13(1), 16-22. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22920/38223>
4. Alvarado y Rivero, (2009). Efecto Antagónico de *Lactobacillus plantarum* Aislado de Pastizal de Finca Lechera. *Salud Pública y Nutrición*. Obtenido de <https://docplayer.es/78840834-Efecto-antagonico-de-lactobacillus-plantarum-aislado-de-pastizal-de-finca-lechera.html>
5. Alvis, L., Perez, A., y Cordero, A. (2017). Efecto Inhibitorio de compuestos Tipo Metabolitos de Bacterias Endófitas Contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Burkholderia glumae*. Revista Colombiana de Ciencia Animal, 18-25. doi:<https://doi.org/10.24188/recia.v9.nS.2017.516>
6. Astorga, K., Meneses, K., Zuñiga, C., y Rivera., W. (2013). Evaluación del Antagonismo de *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* Contra Tres Patógenos del Ajo. Tecnología en Marcha, 27, 82-91. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/285230802\\_Evaluacion\\_del\\_antagonismo\\_de\\_Trichoderma\\_sp\\_y\\_Bacillus\\_subtilis\\_contra\\_tres\\_patogenos\\_del\\_ajo](https://www.researchgate.net/publication/285230802_Evaluacion_del_antagonismo_de_Trichoderma_sp_y_Bacillus_subtilis_contra_tres_patogenos_del_ajo)
7. Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez., M. (2011). Aislamiento y Caracterización de Cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Brasileira de Agroecología, 90-99.
8. Barrera, A. (2015). Control Químico del Manchado de Grano de la Variedad de Arroz INIAP 15 en la Provincia de los Ríos. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador.
9. Barría, (2012). Diagnóstico del Sector Arroceros de Panamá. Honduras: ZAMORANO-Departamento de Administración de Agronegocios.
10. Benavides, H. (2007). Propuesta de Guía de Aplicación de Técnicas De Microbiología (Bacterias y Hongos) Para ser Utilizado en Microbiología General. El Salvador: Sistema Bibliotecario, Universidad de El Salvador. doi:<http://ri.ues.edu.sv/4768/1/16100029.pdf>
11. Benitez, S, (2007). Aislamiento de los Microorganismos Cultivables de la Rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y Evaluación del Posible Efecto Biocontrolador en Dos

- Patógenos del Suelo. *Nova*, 5(8), 147-153. Obtenido de <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/383/383>
12. Benitez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L., y Corrales, L. (2007). Aislamiento de los Microorganismos Cultivables De La Rizosfera De *Ornithogalum umbellatum* y Evaluación Del Posible Efecto Biocontrolador en dos Patógenos del Suelo. *NOVA*, 5(8), 147-153. doi:doi:<http://dx.doi.org/10.22490/24629448.383>
  13. Cabra, T., Rodríguez, C., y Villota, C. (2014). Capacidad Antagónica y Quitinolítica de Microorganismos Aislados de Residuos De Higuera ( *Ricinus communis*). Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 12(1), 56-61. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n1/v12n1a07.pdf>
  14. Camargo, I. (2012). Compendio las Variedades Mejoradas de Arroz del IDIAP. Panamá. Obtenido de Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá: <http://www.idiap.gob.pa/download/compendio-las-variedades-mejoradas-de-arroz-del-idiap/>
  15. Camargo, I., Quiróz, E., y Zachrisson, B. (2014). Innovación Tecnológica Para El Manejo Integrado del Cultivo de Arroz en Panamá. Panamá: Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).
  16. Caselles, J. R. (2003). Capacidad Antagonista De *Penicillium Oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma Harzianum* Rifai Frente a Diferentes Agentes Fitopatógenos. . Universidad Politécnica De Valencia .
  17. Castellano, L. (2002). Prospección de hongos antagonistas en la Provincia de Cienfuegos. *Universidad de Pamplona*.
  18. Chaves, M. (2016). Comunicación Oral. Metodología para el Enfrentamiento *in vitro* de Hongos.
  19. Cristancho, J. y Agudelo, D. (2009). Actividad Antagónica entre Bacterias Epibióticas Aisladas de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano y su Relación con la Macroepibiosis. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR, 25-38. Recuperado el 2017, [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012297612009000100002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012297612009000100002&lng=es&tlng=es).
  20. EcuRed. (2010). EcuRed-Definición de Microorganismos. Obtenido de <https://www.ecured.cu/Microorganismo>.
  21. Espinosa, L. E. (2014). Comparación de la Eficacia de Beauveria Bassiana contra la de Métodos Convencionales para el Control de Tortuguilla (Colaspissp. Coleoptera) en Banano sede Regional de Coatepeque; Noviembre De 2014. *Universidad Rafael Landívar Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas*.
  22. Ethur, L., Blume, E., Muniz, M., y Silva, A. d. (2004). Fungos Antagonistas a Sclerotinia sclerotiorum em Pepineiro Cultivado. Universidad Federal de Santa Maria, 127-133. Obtenido de <http://www.scielo.br/pdf/fb/v30n2/a04v30n2>

23. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (**FAO**). (2018). Portal del Suelos de La FAO. Obtenido de <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/>
24. Fernandez, O. (2001). Microorganismos Antagonistas para el Control Fitosanitario. Revista Manejo Integrado de Plagas, 96-100.
25. García, I. (2011). Microorganismos del Suelo y Sustentabilidad de los Agroecosistemas. Revista Argentina de Microbiología, 1-3.
26. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), (2009). Plan De Acción para la Competitividad de la Cadena de Arroz de Panamá: Hacia un Mecanismo de Reconocimiento de la Calidad. Plan De Acción para la Competitividad de la Cadena de Arroz De Panamá. San José, Costa Rica. Recuperado el 10 de Diciembre de 2017, de Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá: <https://www.mida.gob.pa/upload/documentos/plan-de-accion-de-arroz-para-la-competitividad-de-la-cadena%5B1%5D.pdf>
27. Infante, D; González, N.; y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de Acción de *Trichoderma sp*, Frente a Hongos Fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal, 24(1), 14-21. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002)
28. Jaramillo, D. (2002). Introducción a la Ciencia del Suelo. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el Octubre de 2017, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>
29. Lizarro, C., y Restrepo, J. (2014). Biología de Suelos-Universidad de Antioquia. Obtenido de <https://biologiadelsuelos2014.wordpress.com/organismos-del-suelo-2/microbiologia-del-suelo/hongos-del-suelo/>
30. Lopez, L., & Torres, C. (2006). Estudio cuantitativo de bacterias, Recuento de Colonias en Placa. Obtenido de Universidad Nacional del Nordeste: Universidad Nacional del Nordeste
31. Lopez, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Gonzalez, G., y Franco., R. (2014). Las Tinciones Básicas En el Laboratorio de Microbiología. Revista Investigación en Discapacidad, 3(1), 10-18. doi:<http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
32. Name, B., y Cordero, A. (1987). Alternativas para uso y manejo de suelo ácidos en Panamá-Compendio de Resultados de Investigación en la Jornada Científica. Panamá: Intituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.
33. Pedraza, D. (2012). Estado del Arte de *Burkholderia glumae* como Patógeno de Cultivos de Arroz (*Oryza sativa L.*). Bogota, Colombia: Pontifica Universidad Javeriana.
34. Perez, C. A., y Chamorro, A. L. (2012). Bacterial Endophytes: An Alternative Biological Control in *Burkholderia glumae* Rice In Colombia. Revista Colombiana de Ciencia Animal-REICA, 4(1), 172-184. Recuperado el 10 de Diciembre de 2017, de <http://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/306/348>

35. Poveda, I., y Cruz, M. (2010). Caracterización de Cepas Bacterianas Aisladas de la Filosfera de *Musa spp.* con Actividad Antifúngica *In Vitro* Frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Revista Biotecnología Vegetal, 10(1), 57-61. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/272/html>
36. Quesada, A., y García., F. (2014). *Burkholderia glumae* In the Rice Crop in Costa Rica. 25(2), 371-381. Obtenido de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/15452/14942>
37. Quirós, K., Montero, K., Vega, C., Madriz, J., y Mendez, W. (2014). Evaluación del Antagonismo De *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* Contra tres Patógenos del Ajo. Revista Tecnología en Marcha, 27(2), 89-91. doi:<http://dx.doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
38. Rivera, W. (2015). Control Microbiológico como Experiencia de Sostenibilidad Local en la Agricultura Centroamericana. Tecnología en Marcha, 31-40.
39. Rodríguez, J. (2016). *Magnaporthe oryzae*, Un Hongo de Difícil Control y de Efectos Devastadores en Nuestros Cultivos de Arroz. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA. Parque Científico y Tecnológico de la UPM.
40. Tejera, B., Rojas, M., y Heydrich, M. (2011). Potencialidades del Género *Bacillus* en la Promoción del Crecimiento Vegetal y el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología, 131-138.
41. Villa, E., Parra, F., Cira, L. A., y Villalobos, S. (2017). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología, 95-131.
42. Villarreal, M. F. (2017). El género *Bacillus spp* como agente de control biológico y sus Implicaciones en la Bioseguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología, 95-130. Obtenido de <http://www.rmfm.smf.org.mx/ojs/index.php/RMF/article/view/100/97>.
43. Yau, J. (Octubre de 2016). Comunicación Oral. Características de la parcela de arroz en Los Alveos, Distrito de Antón. . (J. Tuñón, Entrevistador)

# **ANEXOS**

# **Anexo I.**

## *Características fisicoquímicas del suelo de la parcela muestreada*

Parámetro	%Are-Lim-Arc		%MO	pH							
Resultado	70-8-12		1.04	5.80							
ELEMENTOS											
Parámetro	P mg/l	K mg/l	Ca Cmol/Kg	Mg Cmol/Kg	Al Cmol/Kg	Mn mg/l	Fe mg/l	Zn mg/l	Cu mg/l		
Resultado	17.00	79.00	6.80	1.80	0.40	105.30	128.00	2.00	5.00		
Interpretación	Bajo	medio	alto	alto	bajo	alto	alto	bajo	medio		
RELACIONES											
Parámetro	Ca/Mg	(Ca+Mg)/K	K/Mg	Mg/K	Ca/K	CICE	Saturación Al	K/CICE	Ca/CICE	Mg/CICE	Sat. De bases
Resultado	3.78	42.57	0.11	8.91	33.66	9.20	4.35	2.20	73.90	19.56	95.65
Interpretación	normal	fuera de rango	fuera de rango	Normal	fuera de rango	bajo	bajo	medio	alto		

El contenido de nutrientes según los niveles críticos establecidos por Name y Cordero (1987), presenta niveles altos de calcio (Ca), magnesio (Mg), manganeso (Mn) y de hierro (Fe); niveles medios de potasio (K) y de cobre (Cu); además unos niveles bajos de fosforo (P), aluminio (Al) y zinc (Zn). En cuanto a sus características físico-químicas, presenta una textura franco arenosa, con una coloración en seco pardo pálido, pH acido, una capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE) baja, con una baja saturación de aluminio y una elevada saturación de bases, la cual está dominada por la saturación de calcio (73.9%) y un nivel bajo de materia orgánica.



## **Anexo 2.**

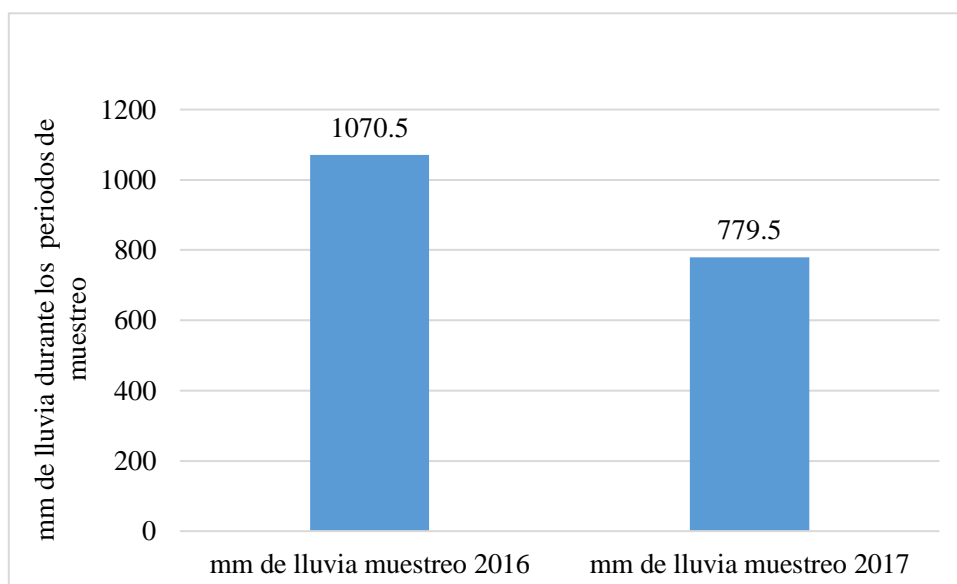
*Aislamientos totales de bacterias rizosféricas por ciclo de cultivo, fase fenológica, sección de la rizósfera y dilución.*

<b>Variables evaluadas</b>	<b>Bacterias aisladas de la rizósfera</b>	<b>Bacterias que presentaron halo de inhibición</b>	<b>Bacterias con halo de inhibición <math>\geq 4\text{mm}</math></b>	<b>Bacterias identificadas (mayor diámetro en el halo de inhibición)</b>
<b>1. Ciclo de Cultivo</b>				
<i>Primer ciclo</i>	172	8	4	8
<i>Segundo ciclo</i>	145	23	12	2
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>10</b>
<b>2. Fase Fenológica</b>				
<i>vegetativa</i>	110	14	6	3
<i>floración</i>	122	6	3	4
<i>maduración</i>	85	11	7	3
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>10</b>
<b>3. Sección de la rizósfera</b>				
<i>raíz</i>	105	13	7	4
<i>suelo</i>	106	6	3	1
<i>suelo raíz</i>	106	12	6	5
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>10</b>
<b>4. Dilución</b>				
$10^{-1}$	18	1	0	0
$10^{-2}$	42	2	1	0
$10^{-3}$	58	6	5	4
$10^{-4}$	64	8	6	4
$10^{-5}$	51	4	1	0
$10^{-6}$	44	6	1	1
$10^{-7}$	40	31	2	1
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>10</b>

### **Anexo 3.**

*Milímetros de lluvia registrados durante los dos ciclos de muestreo*

Muestreo 2016		Muestreo 2017	
<i>Mes</i>	<i>mm de lluvia</i>	<i>Mes</i>	<i>mm de lluvia</i>
agosto	203.5	mayo	209.5
septiembre	137	junio	251
octubre	307	julio	137
noviembre	273.5	agosto	74.5
diciembre	149.5	septiembre	107.5
<b>TOTAL</b>	<b>1070.5</b>	<b>TOTAL</b>	<b>779.5</b>



#### **Anexo 4.**

#### **Procedencia De Las Cepas Identificadas Con El Mejor Potencial Antagónico Frente A *B.glumae*.**

*Valores medios del diámetro del halo de inhibición para el enfrentamiento entre las bacterias antagonistas identificadas Vs **Burkholderia glumae** en el cultivo de arroz.*

Ciclo	Fase	Sección	Dilución	Microorganismo	Cepa
Segundo ciclo	vegetativa	suelo	10-4	<i>Bacillus sp</i>	BS10 <sup>-4</sup> 1.1
Segundo ciclo	floración	Suelo+raíz	10-3	<i>Bacillus sp</i>	1.BSR10 <sup>-3</sup> 2.1
Segundo ciclo	floración	Suelo+raíz	10-3	<i>Bacillus subtilis</i>	BSR10 <sup>-3</sup> 2.1
Segundo ciclo	maduración	Suelo+raíz	10-4	<i>Bacillus sp</i>	BSR10 <sup>-4</sup> 1.1
Segundo ciclo	maduración	Suelo+raíz	10-3	<i>Bacillus cerus</i>	BSR10 <sup>-3</sup> 1.1
Segundo ciclo	vegetativa	raíz	10-7	<i>Bacillus sp</i>	BR10 <sup>-7</sup> 1.1
Primer ciclo	floración	Suelo+raíz	10-3	<i>Bacillus sp</i>	RS+R10 <sup>-3</sup> 2.1
Segundo ciclo	maduración	raíz	10-4	<i>Bacillus cerus</i>	BR10 <sup>-4</sup> 1.2
Segundo ciclo	vegetativa	raíz	10-4	<i>Bacillus sp</i>	BR10 <sup>-4</sup> 2.1
Primer ciclo	floración	raíz	10-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	RR10 <sup>-6</sup> 1.1

Del total de bacterias identificadas con actividad antagónica, 2 fueron aisladas durante el primer ciclo del cultivo y 8 durante el segundo ciclo. En cuanto a las fases fenológicas, se aislaron 3 de la fase vegetativa, 4 de la floración y 8 de la maduración. 4 cepas fueron aisladas de la sección “Raíz”, 1 de la sección “Suelo” y 3 de la sección “Suelo+Raíz”. 4 cepas fueron aisladas de la dilución 10<sup>-3</sup>, 4 de la dilución 10<sup>-4</sup>, 1 de la dilución 10<sup>-6</sup> y 1 de la dilución 10<sup>-7</sup> (tabla 8).


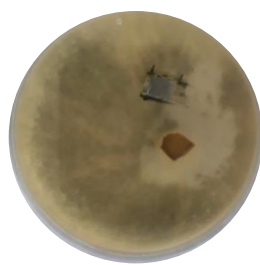
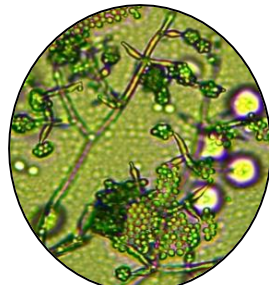
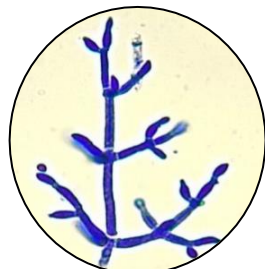
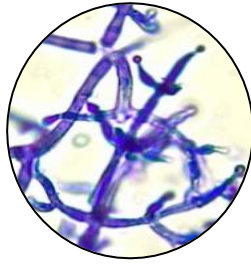
**Anexo 5.**

*Aislamientos totales de hongos rizosféricos por ciclo de cultivo, fase fenológica, sección de la rizósfera y dilución.*

<b>Variables evaluadas</b>	<b>Hongos aislados de la rizósfera</b>
<b>1. Ciclo de Cultivo</b>	
<i>Primer ciclo</i>	40
<i>Segundo ciclo</i>	72
<i>Total</i>	112
<b>2. Fase Fenológica</b>	
<i>vegetativa</i>	30
<i>floración</i>	39
<i>maduración</i>	43
<i>Total</i>	112
<b>3. Sección de la rizósfera</b>	
<i>raíz</i>	105
<i>suelo</i>	106
<i>suelo+raíz</i>	106
<i>Total</i>	112
<b>4. Dilución</b>	
<i>10-1</i>	27
<i>10-2</i>	32
<i>10-3</i>	27
<i>10-4</i>	12
<i>10-5</i>	5
<i>10-6</i>	5
<i>10-7</i>	4
<i>Total</i>	112

## Anexo 6.

### Características macro y microscópicas de los hongos identificados

Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá						
Responsables: Jhoel Tuñón						
Microorganismo: <i>Trichoderma sp.</i>		Identificación: Placa N°27 (HS10 <sup>-2</sup> 2.2)				
<b>Condiciones de crecimiento:</b> Plato petri con medio PDA a 28°C, alternado 18 horas luz y 6 de oscuridad, durante 5 días.		Historial				
		<i>Asilamiento:</i> agosto 2017				
		<i>Ciclo del cultivo:</i> segundo ciclo				
		<i>Fase fenológica:</i> maduración				
		<i>Sección de la rizosfera:</i> suelo rizosférico				
<b>Almacenamiento:</b> Tubo inclinado con medio PDA		<i>Dilución:</i> 10 <sup>-3</sup>				
		<b>Observación:</b> aislado en las siguientes fases				
		Ciclo del cultivo	Fase Fenológica	Sección de la rizosfera	Código	%Inhibición Promedio
		1	V	S+R	RSR10-2 2.1	58
		1	M	S	RS10-3 2.1	61
		2	V	S+R	HSR10 <sup>-1</sup> 2.1	44
		2	F	S	HS10 <sup>-4</sup> 2.1	62
		2	F	S+R	HSR10 <sup>-4</sup> 2.1	67
<b>Conservación:</b> Tubos ependorf con Glicerol al 30% a temperatura de -80 °C		2	F	S+R	HSR10-4 2.1	67
Características Macroscópicas						
<b>Anverso.</b> La colonia es de color blanco con verde oscuro, aterciopelada, algodonosa.			<b>Reverso.</b> Colonia verde oscuro y amarillo cremoso en el centro.			
						
Características Microscópicas						
Presenta hifas septadas, los conidióforos son segmentos cortos, mostrando en su parte terminal pequeños conidios redondeados, de paredes lisas.						
						
Objetivo 40x		Objetivo 40x		Objetivo 40x		

**Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá**

**Responsables:** Jhoel Tuñón

**Microorganismo:**

*Aspergillus niger*

**Identificación: Placa N°15 (HSR10-<sup>3</sup> 1.2)**

## Historial

**Condiciones de crecimiento:** Plato petri con medio PDA a 28°C, alternado 18 horas luz y 6 de oscuridad, durante 5 días.

**Asilamiento:** julio 2017

**Ciclo del cultivo:** segundo ciclo

**Fase fenológica:** floración

**Sección de la rizosfera: suelo + raíz**

Dilución:  $10^{-3}$ 

<b>Almacenamiento:</b>	Tubos inclinados con medio PDA
------------------------	--------------------------------

<b>Conservación:</b>
----------------------

Tubos ependorf con Glicerol al 30% a temperatura de -80 °C

<b>Observación:</b> aislado en las siguientes fases
---

Ciclo del cultivo	Fase Fenológica	Sección de la rizosfera	Género	Código	%Inhibición Promedio
2	F	S	<i>A. niger</i>	HS10 <sup>-2</sup> 1.1	75
2	F	S+R	<i>A. niger</i>	HSR10-3 2.1	75
2	M	S+R	<i>A. niger</i>	HSR10-3 2.2	61

Características Macroscópicas	
-------------------------------	--

**Anverso.** Colonias al principio blancas y posteriormente negras, textura similar a la pimienta



**Reverso.** Color amarillo a crema, tornándose a café claro



Características Microscópicas	
Forma	Elongada, cilíndrica, con extremos redondeados.
Tamaño	Entre 2 y 5 micrómetros de longitud.
Color	Transparente o ligeramente amarillento.
Refringencia	Alta, especialmente en los polos.
Movimiento	Amoeboides, sin flagelos.
Reacción a Gram	Negativa.
Reacción a Ziehl-Neelsen	Negativa.
Reacción a Papanicolaou	Presencia de células con citoplasma abundante y vacuolado.

Hifas septadas, hialinas, conidióforo pared lisa, hialinos, largos, vesículas globosa grande, subesferica, globosa negras, subesferica, fiálidess bisériadas.



*Objetivo 40x*



**Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá**

**Responsables:** Jhoel Tuñón

<b>Microorganismo</b>	<i>Aspergillus sp.</i>
-----------------------	------------------------

**Identificación: Placa N°27 (HS10-3 1.1)**

### Condiciones de crecimiento

Plato petri con medio PDA a 28°C, alternado 18 horas luz y 6 de oscuridad, durante 10 días.

## Historial

*Asilamiento: julio 2017*

*Ciclo del cultivo: segundo ciclo*

*Fase fenológica: floración*

*Sección de la rizosfera: suelo rizosférico*

*Dilución: 10-3*

## Almacenamiento

Tubo inclinado con medio PDA

Tubos ependorff con Glicerol al 30% a temperatura de -80 °C

**Observación:** *aislado en las siguientes fases*

Ciclo del cultivo	Fase Fenológica	Sección de la rizosfera	Género	Código	%Inhibición Promedio
1	M	R	Aspergillus sp	RR10-2 2.1	48
2	F	S*R	Aspergillus sp	HRS10-3 1.1	56

Características Macroscópicas	
-------------------------------	--

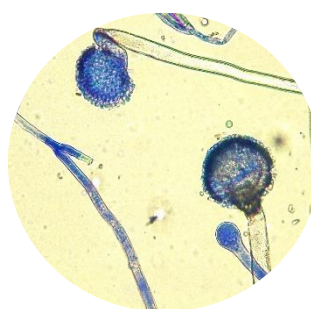
**Anverso.** Colonias inician blancas u luego se tornan amarillas-verdosas pulverulentas

**Reverso.** Coloración verde oliva




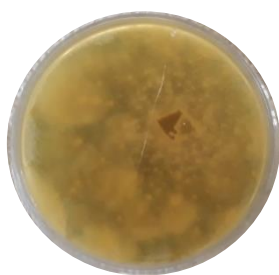
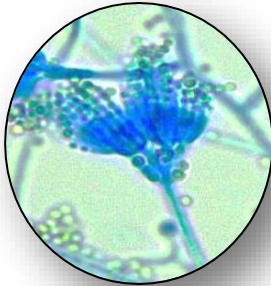
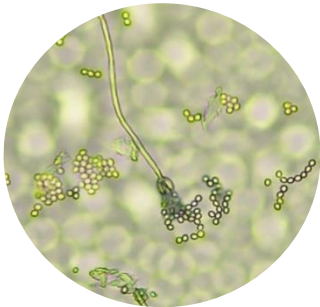
Características Microscópicas	
Forma	Elongada, cilíndrica, con extremos redondeados.
Tamaño	Entre 2 y 4 micrómetros de longitud.
Color	Transparente o ligeramente amarillento.
Refringencia	Alta, especialmente en los polos.
Movimiento	Amoeboides, sin flagelos.
Reacción a Gram	Negativa.
Reacción a Ziehl-Neelsen	Negativa.
Reacción a Papanicolaou	Positiva, muestra células típicas de <i>Neisseria meningitidis</i> .

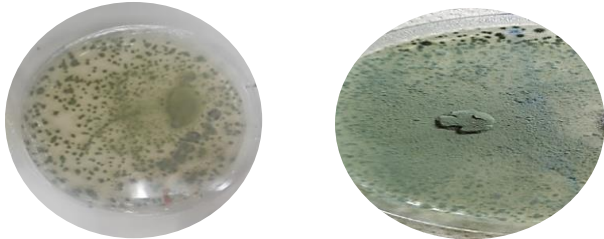
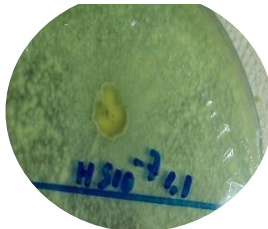
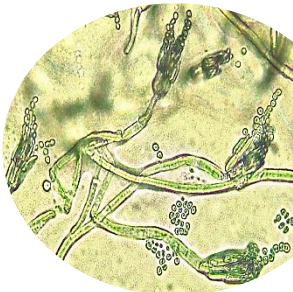

Conidioforos hialinos de pared rugosa. Cabezuela radiada, uni y biseriada, vesículas esféricas.



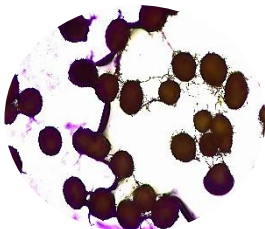





**Objetivo 40x**



Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá							
Responsables:							
Microorganismo	Penicillium sp (r2)	Identificación: Placa N° HSR10-3 1.2					
Condiciones de crecimiento		Historial					
Plato petri con medio PDA a 28°C, alternado 18 horas luz y 6 de oscuridad, durante 10 días.		Asilamiento: julio 2017 Ciclo del cultivo: segundo ciclo Fase fenológica: floración Sección de la rizosfera: suelo + raíz Dilución: 10-3					
Almacenamiento	Tubo inclinado con medio PDA	Observación: aislado en las siguientes fases					
Conservación	Discos estériles de papel filtro	Ciclo del cultivo	Fase Fenológica	Sección de la rizosfera	Género	Código	%Inhibición Promedio
		2	F	suelo+raíz	Penicillium sp (r2)	HSR10-3 1.2	55
		2	M	suelo+raíz	Penicillium sp (r2)	HSR 10-3 1.1	48
Características Macroscópicas							
Anverso. Generalmente bordes blancos, con textura algodonosa, la superficie de la colonia se torna color verde azulado cambiando con los días a un verde oliva.				Reverso. coloración verde claro			
							
Características Microscópicas							
Conidióforos de paredes lisas y gruesas, métulas ensanchadas, Fíalides en grupos de forma cilíndrica, con ápice inflado, conidios globosos a subglobosos.							
							
Objetivo 40x			Objetivo 40x				

Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá							
Responsables:							
Microorganismo	Penicillium sp (r1)	Identificación: Placa N° (HSR10-6 2.1)					
Condiciones de crecimiento	Plato petri con medio PDA a 29°C, alternado 18 horas luz y 6 de oscuridad, durante 10 días.	Historial					
		Asilamiento: junio 2017 Ciclo del cultivo: segundo ciclo Fase fenológica: vegetativa Sección de la rizosfera: suelo + raíz Dilución: 10-6					
Almacenamiento	Tubo inclinado con medio PDA	Observación: aislado en las siguientes fases					
Conservación	Discos estériles de papel filtro	Ciclo del cultivo	Fase Fenológica	Sección de la rizosfera	Género	Código	%Inhibición Promedio
		1	F	S+R	Penicillium sp (r1)	HSR10-6 2.1	44
		1	M	S	Penicillium sp (r1)	RS10-4 1.1	65
		2	V	S+R	Penicillium sp (r1)	HSR10-6 2.1	44
		2	V	S+R	Penicillium sp (r1)	HSR10-7 2.1	25
		2	F	S	Penicillium sp (r1)	HS10-7 1.1	67
Características Macroscópicas							
Anverso. Colonia pulverenta verde oscuro			Reverso. coloración verde claro, centro amarillo				
							
Características Microscópicas							
Conidióforo cortos hialinos, métulas en forma de botella, fiálides con el ápice puntiagudo, conidios verde claro globosos.							
							
Objetivo 40x			Objetivo 40x				

Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá							
Responsables:							
Microorganismo	Morfotipo 1	Identificación: HR10-1 1.2					
Condiciones de crecimiento	Plato petri con medio PDA a 29°C, alternado 18 horas luz y 6 de oscuridad, durante 10 días.	Historial					
		Asilamiento: agosto 2017 Ciclo del cultivo: segundo ciclo Fase fenológica: maduración Sección de la rizosfera: Raíz Dilución: 10-1					
Almacenamiento	Tubo inclinado con medio PDA	Observación: aislado en las siguientes fases					
Conservación	Discos estériles de papel filtro	Ciclo del cultivo	Fase Fenológica	Sección de la rizosfera	Género	Código	%Inhibición Promedio
		2	V	R	Morfotipo 1	HR <sup>10-1</sup> 2.1	27
		2	F	S	Morfotipo 1	HS10 <sup>-2</sup> 2.1	36
		2	F	<u>S</u>	Morfotipo 1	HS10 <sup>-3</sup> 1.1	21
		2	M	R	Morfotipo 1	HR10-1 1.2	9
		2	M	S+R	Morfotipo 1	HSR10-1 1.1	59
Características Macroscópicas Plato Petri							
Anverso. Colonia al principio blancas, a medida que pasa el tiempo toman una coloración crema a chocolate		Reverso. Coloración amarilla en las orillas y chocolate en el centro, observándose anillos.					
							
Características Microscópicas							
10x      40x							
							

Identificación de Hongos, CRU de Coclé, Universidad de Panamá							
MORFOTIPOS							
Responsables: Jhoel Tuñón							
Microorganismo	Morfotipo 2	Identificación: HSR10-4 1.1					
Condiciones de crecimiento	Plato petri con medio PDA a 29°C, alternado 18 horas luz y 6 de oscuridad, durante 10 días.	Historial					
		<i>Asilamiento: junio 2017</i> <i>Ciclo del cultivo: segundo ciclo</i> <i>Fase fenológica: vegetativa</i> <i>Sección de la rizosfera: suelo + raíz</i> <i>Dilución: 10-6</i>					
Almacenamiento	Tubo inclinado con medio PDA	Observación: aislado en las siguientes fases					
Conservación	Discos estériles de papel filtro	Ciclo del cultivo	Fase Fenológica	Sección de la rizosfera	Género	Código	%Inhibición Promedio
		1	V	S	Morfotipo 2	RS10-1 2.1	11
		1	F	R	Morfotipo 2	RR10-4 1.1	31
		2	V	S	Morfotipo 2	HS <sup>10-3</sup> 2.1	20
		2	M	S+R	Morfotipo 2	HSR10-4 1.1	25
Características Macroscópicas Plato Petri							
<b>Anverso.</b> Colonias de crecimiento rápido marrón oscuro, algodonosas  		<b>Reverso.</b> Coloración negro oscuro, marrón oscuro en las orillas  					
Características Macroscópicas Tubo de ensayo							
No se observó estructuras microscópicas.							

**Anexo 7.**

Porcentajes de inhibición de los hongos identificado frente a *P. oryzae*, a los 3, 5 y 8 días de enfrentamiento.

<b><i>Género</i></b>	<b><i>%Inhibición a los 3 días</i></b>	<b><i>%Inhibición a los 5 días</i></b>	<b><i>%Inhibición a los 8 días</i></b>
<i>A. flavus</i>	20	41	56
<i>A. niger</i>	40	70	71
<i>Aspergillus spp.</i>	24	62	52
<i>Penicillium spp. (r1)</i>	43	51	51
<i>Penicillium spp. (r2)</i>	30	56	47
<i>Trichoderma spp.</i>	31	53	60